

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5850843号
(P5850843)

(45) 発行日 平成28年2月3日(2016.2.3)

(24) 登録日 平成27年12月11日(2015.12.11)

(51) Int.Cl.	F 1
C 07 K 16/28	(2006.01) C 07 K 16/28 Z N A
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08
A 01 K 67/027	(2006.01) A 01 K 67/027
A 61 K 51/00	(2006.01) A 61 K 49/02 C
G 01 T 1/161	(2006.01) G 01 T 1/161 A

請求項の数 19 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-537224 (P2012-537224)
(86) (22) 出願日	平成22年11月4日 (2010.11.4)
(65) 公表番号	特表2013-510093 (P2013-510093A)
(43) 公表日	平成25年3月21日 (2013.3.21)
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/055465
(87) 國際公開番号	W02011/056983
(87) 國際公開日	平成23年5月12日 (2011.5.12)
審査請求日	平成25年10月29日 (2013.10.29)
(31) 優先権主張番号	12/612,912
(32) 優先日	平成21年11月5日 (2009.11.5)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(72) 発明者	ジル, ハーマン アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ジルコニウム放射性標識化システイン改変抗体コンジュゲート

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

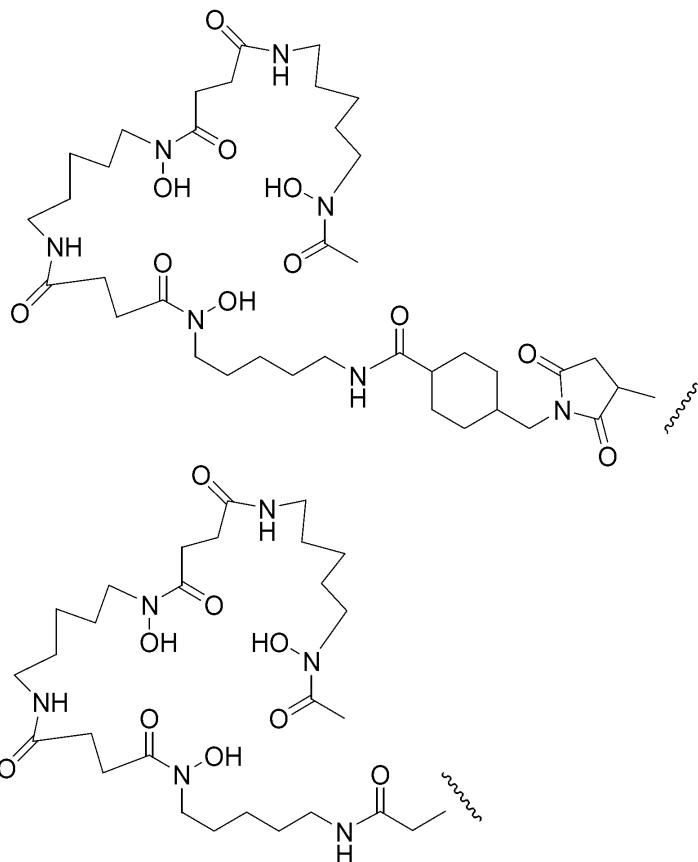
式 I :



(上式中、p は 1 から 4 である)

を有し、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びジルコニウム錯体 (Z) へ結合したシステイン改変抗体 (Ab) を含む、ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体であって、

システイン改変抗体が、リンカー及び



から選択されるデスフェリオキサミン成分へ結合し、
波線は抗体への結合を示し；ジルコニウムはデスフェリオキサミン成分へ錯体形成し；
及び
システィン改変抗体が、配列番号 11、12、13、15及び38：

LTVVCSASTKGPS 配列番号:11

LTVVSCASTKGPS 配列番号:12

LTVVSSCSTKGPS 配列番号:13

HTFPCVLQSSGLYS 配列番号:15

PPVLDLCDGSFF 配列番号:38

から選択される重鎖配列を含み、ここで配列番号 11、12、13、15及び38のシスティンは遊離システィンアミノ酸であり、又はシスティン改変抗体が、配列番号 17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、45、及び46：

10

20

30

40

SLSASCGDRV	(配列番号:17)	
QKPGKCPKLL	(配列番号:18)	
EIKRTCAAPS	(配列番号:19)	
TCAAPCVFIFPP	(配列番号:20)	
FIFPPCDEQLK	(配列番号:21)	
DEQLKCGTASV	(配列番号:22)	10
FYPRECKVQWK	(配列番号:23)	
WKVDNCLQSGN	(配列番号:24)	
ALQSGCSQESV	(配列番号:25)	
VTEQDCKDSTY	(配列番号:26)	
GLSSPCTKSFN	(配列番号:27)	
FLSVSCGGRVT	(配列番号:45)	20
QKPGNCPRLLI	(配列番号:46)	

から選択される軽鎖配列を含み、ここで配列番号 17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、45、及び46のシステインは遊離システインアミノ酸である、ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 2】

p が 2 である、請求項 1 に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 3】

システイン改変抗体が

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発し、

30

(i i) システイン改変抗体を発現し、及び

(i i i) システイン改変抗体を単離し精製する

ことを含む方法により調製される、請求項 1 に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 4】

システイン改変抗体がモノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、F a b 断片から選択される、請求項 1 に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 5】

システイン改変抗体が A 1 2 1 C チオ-トラスツズマブである、請求項 1 に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

40

【請求項 6】

システイン改変抗体が親抗体の一以上のアミノ酸残基を一以上の遊離システインアミノ酸で置換することを含む方法で調製され、親抗体は抗原に選択的に結合し、システイン改変抗体は、親抗体と同じ抗原に選択的に結合する、請求項 1 に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 7】

システイン改変抗体又は親抗体が、レセプター (1) - (5 1) :

(1) B M P R 1 B (骨形成タンパク質レセプター I B 型) ;

(2) E 1 6 (L A T 1 , S L C 7 A 5) ;

50

- (3) STEAP1 (前立腺の6回膜貫通型上皮抗原) ;
 (4) 0772P (CA125, MUC16) ;
 (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核球増強因子、メソテリン) ;
 (6) Nap13b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, 溶質輸送体ファミリー34 (リン酸ナトリウム), メンバー2, II型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター3b) ;
 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Hlog, セマドメイン (sema domain), 7回トロンボスponジン反復 (1型及び1型様), 膜貫通ドメイン (TM) および短い細胞質ドメイン (セマフォリン) 5B) ;
 (8) PSCA h1g (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 遺伝子) ;
 (9) ETBR (エンドセリンB型レセプター) ;
 (10) MSG783 (RNF124, 推定タンパク質FLJ20315) ;
 (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, 前立腺癌関連遺伝子1, 前立腺癌関連タンパク質1, 前立腺の6回膜貫通型上皮抗原2, 6回膜貫通型前立腺タンパク質) ;
 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 一過性レセプター電位カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4) ;
 (13) Cripto (CR, CR1, CRGF, Cripto, TDGF1, 奇形癌腫由来増殖因子) ;
 (14) CD21 (CR2 (補体レセプター2) 又はC3DR (C3d / エプスタイン・バーウイルスレセプター) 又はHs.73792) ;
 (15) CD79b (CD79B, CD79, IgB (免疫グロブリン関連ベータ (immunoglobulin-associated beta)) , B29) ;
 (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1a) , SPAP1B, SPAP1C) ;
 (17) HER2 ;
 (18) NCA ;
 (19) MDP ;
 (20) IL20R ;
 (21) ブレビカン ;
 (22) EphB2R ;
 (23) ASLG659 ;
 (24) PSCA ;
 (25) GEDA ;
 (26) BAFF-R (B細胞活性化因子レセプター, BLYSレセプター3, BR3) ;
 (27) CD22 (B細胞レセプターCD22 - Bアイソフォーム) ;
 (28) CD79a (CD79A, CD79, 免疫グロブリン関連アルファ (immunoglobulin-associated alpha) , 免疫グロブリンベータ (CD79B) と共有結合性に相互作用し、IgM分子と表面上で複合体を形成し、B細胞分化に関するシグナルを伝達するB細胞特異的タンパク質) ;
 (29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター1は、CXCL13ケモカインによって活性化され、リンパ球遊走及び体液性防御において機能し、HIV-2感染、おそらくエイズ、リンパ腫、骨髄腫、及び白血病の発症において役割を果たす、Gタンパク質共役型受容体) ;
 (30) HLA-DOB (ペプチドを結合してそれらをCD4+Tリンパ球に提示するMHCクラスII分子 (Ia抗原) のベータサブユニット) ;

10

20

30

40

50

(31) P2X5 (プリンレセプターP2Xリガンド開口型イオンチャネル5は、細胞外ATPにより開閉されるイオンチャネルであり、シナプス伝達及び神経発生に関する可能性があり、欠乏は、特発性排尿筋不安定性の病態生理の一因となり得る)；

(32) CD72 (B細胞分化抗原CD72, Lyb-2)；

(33) LY64 (リンパ球抗原64 (RP105), ロイシンリッチリピート (LRR) ファミリーのI型膜タンパク質であり、B細胞の活性化及びアポトーシスを制御し、機能喪失は全身性エリテマトーデスの患者における疾患活性の上昇に関連する)；

(34) FcRH1 (Fcレセプター様タンパク質1, C2タイプIg様ドメイン及びITAMドメインを含む免疫グロブリンFcドメインについての推定上のレセプターであり、B-リンパ球分化において役割を有し得る)；

(35) IRTA2 (免疫グロブリンスーパーファミリー-レセプタートランスロケーション関連2 (Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2)、B細胞発生及びリンパ腫形成において役割を有し得る推定上の免疫レセプター；一部のB細胞悪性腫瘍においてトランスロケーションによる遺伝子の調節解除が発生する)；

(36) TENB2 (推定上の膜貫通型プロテオグリカン、増殖因子のEGF/ヘレグリンファミリー及びフォリスタチンに関連する)；

(37) PMEL17 (シルバーホモログ；SILV；D12S53E；PMEL17；(SIL)；(SIL)；ME20；gp100)；

(38) TMEMF1 (EGF様及び2つのフォリスタチン様ドメインを有する膜貫通タンパク質1；Tomoregulin-1；H7365；C9orf2；C9ORF2；U19878；X83961)；

(39) GDNF-Ra1 (GDNFファミリー-レセプターアルファ1；GFR-A1；GDNFR；GDNFRA；RETL1；TRNR1；RET1L；GDNFR-アルファ1；GFR-ALPHA-1；U95847；BC014962)；

(40) Ly6E (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E；Ly67, RIG-E, SCA-2, TSA-1)；

(41) TMEM46 (シサホモログ(shisa homolog)2 (アフリカツメガエル)；SHISA2)；

(42) Ly6G6D (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G6D；Ly6-D, MEGT1)；

(43) LGR5 (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体5；GPR49, GPR67)；

(44) RET (retプロトオンコジーン；MEN2A；HSCR1；MEN2B；MTC1；(PTC)；CDHF12；Hs.168114；RET51；RET-ELE1)；

(45) LY6K (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K；LY6K；HSJ001348；FLJ35226)；

(46) GPR19 (Gタンパク質共役型受容体19；Mm.4787)；

(47) GPR54 (KISS1レセプター；KISS1R；GPR54；HOT7T175；AXOR12)；

(48) ASPHD1 (アスパラギン酸-ヒドロキシラーゼドメイン含有1；LOC253982)；

(49) チロシナーゼ (TYR；OCAIA；OCA1A；チロシナーゼ；SHEP3)；

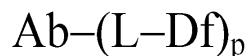
(50) TMEM118 (リングフィンガータンパク質、膜貫通型2；RNFT2；FLJ14627)；及び

(51) GPR172A (Gタンパク質共役型受容体172A；GPCR41；FLJ11856；D15Ert747e)

の一以上と結合する、請求項1に記載のジルコニウム標識されたシステイン改変抗体。

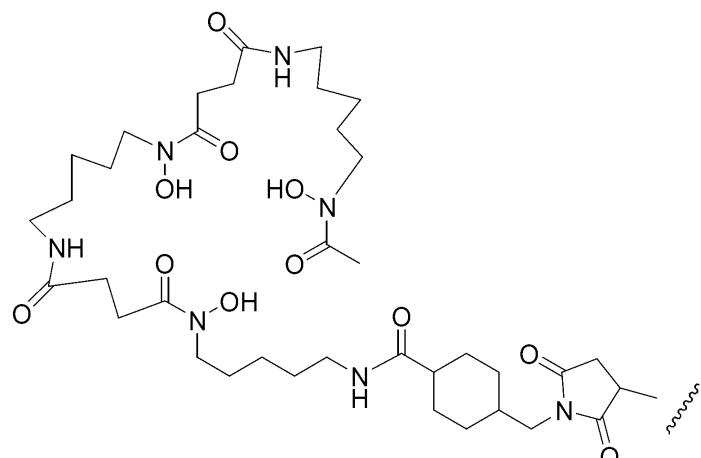
【請求項8】

式 I I :

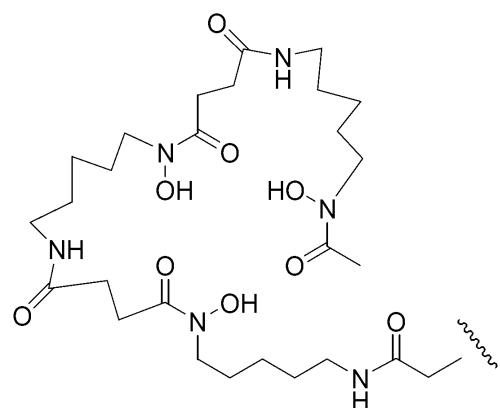


II

(上式中、L-Dfは



10



20

(上記構造において、波線は抗体 (Ab) への結合を示す)

30

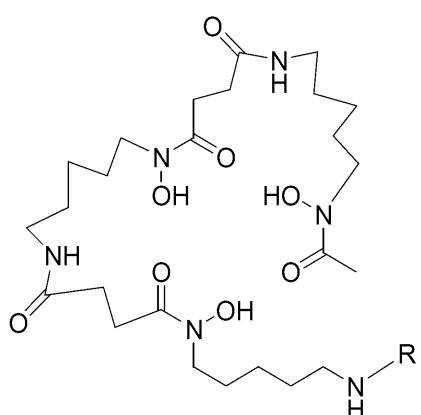
から選択され、及び

pは1から4である)

を有し、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (Df) へ結合するシステイン改変抗体 (Ab) を含む、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体。

【請求項9】

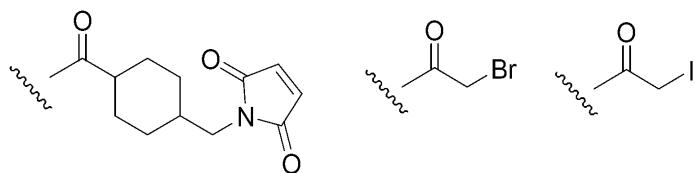
構造：



40

(上記構造において、Rは

50



から選択される)

から選択されるデスフェリオキサミン標識試薬。

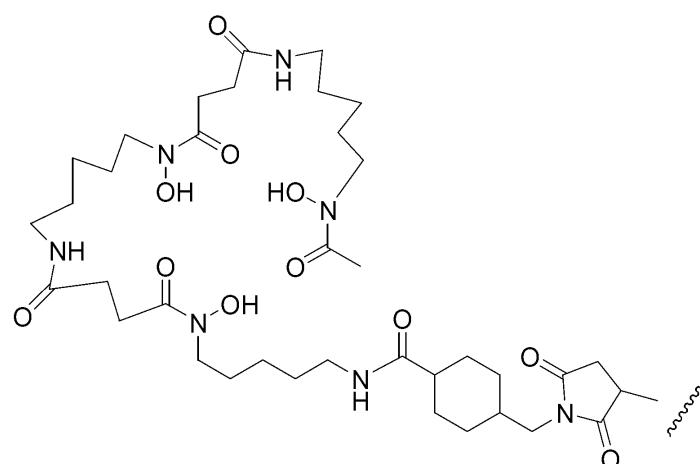
【請求項 10】

式 II :

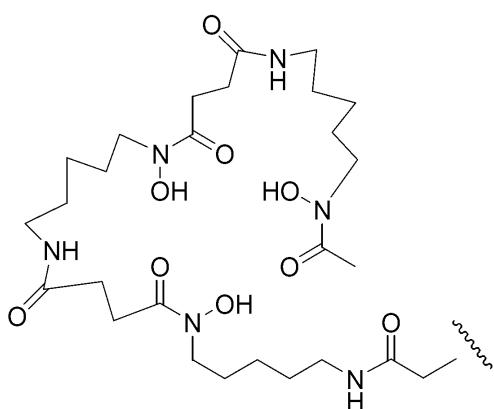
10



(上式中、 L - D f は



20



30

(波線は抗体 (A b) への結合を示す)

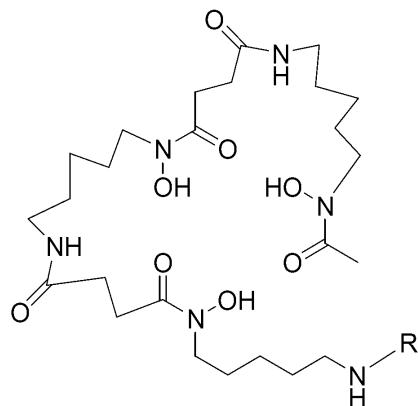
から選択され、及び

40

p は 1 から 4 である)

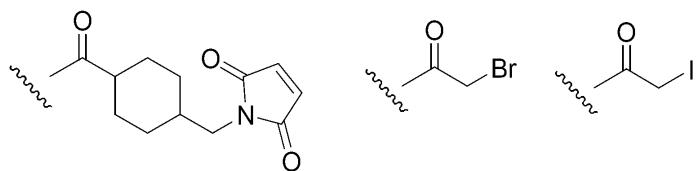
を有し、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (D f) へ結合したシステイン改変抗体 (A b) を含む、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体を作製する方法であって、

構造 :



10

(上記構造において、Rは



20

から選択される)

から選択される組成物を、一以上の遊離システインアミノ酸を有するシステイン改変抗体と反応させることを含み、

それによって、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体が形成される方法。

【請求項 11】

式 I :



(上式中、pは1から4である)

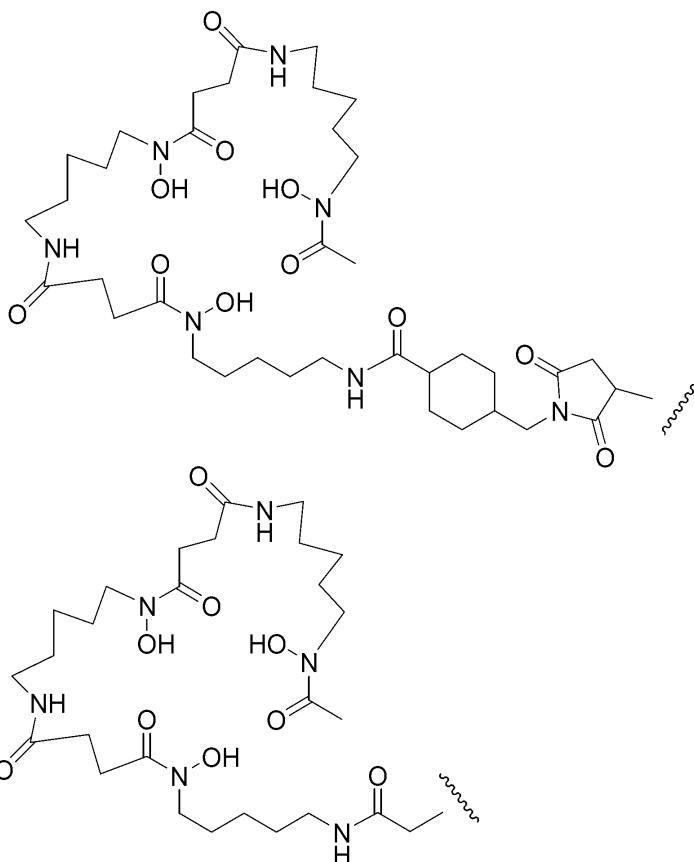
を有し、遊離システインアミノ酸を介してリンカー(L)及びジルコニウム錯体(Z)へ結合したシステイン改変抗体(Ab)を含む、ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体を作る方法であって、

式 II :



(上式中、L-Dfは、

30



(上記構造において波線は抗体 (Ab) への結合を示す)

から選択され、及び

p は 1 から 4 であり、

それによって、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体が形成される)

を有し、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (Df) へ結合したシステイン改変抗体 (Ab) を含む、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体でジルコニウム試薬を錯体化させることを含む方法。

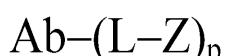
【請求項 1 2】

ジルコニウム試薬が^{8,9}ジルコニウムシュウ酸塩である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体の存在をインビボで検出することによるイメージングのためのキットであって、ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体を含み

該ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体が、式 I :



I

(ここで p は 1 から 4 である)

を有し、リンカー (L) を介して一以上のジルコニウム錯体 (Z) と結合した一以上の遊離システインアミノ酸を持つシステイン改変抗体 (Ab) を含む、キット。

【請求項 1 4】

Z がデスフェリオキサミン B へ錯体形成したジルコニウムを含む、請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体が抗原に結合する、請求項 1 3 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体が腫瘍異種移植マウスマルクに投与される
ものである、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 17】

重鎖に A 1 2 1 C 変異又は S 4 0 0 C 変異を含む、請求項 8 に記載のデスフェリオキサ
ミン標識されたシステイン改変抗体。

【請求項 18】

軽鎖に V 2 0 5 C 変異を含む、請求項 8 に記載のデスフェリオキサミン標識されたシス
テイン改変抗体。

【請求項 19】

軽鎖の位置 1 3 9 から 1 4 9 にある何れかのアミノ酸がシステインで置換されている、
請求項 8 に記載のデスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体。

10

【発明の詳細な説明】**【発明の開示】****【0001】**

本出願は、2005年9月22日に出願した米国特許出願第11/233258号であつて現在2009年4月21日に発行された米国特許第7521541号の継続である、2009年3月6日に出願した米国特許出願第12/399241号の一部継続出願である、2009年11月5日に出願した米国特許出願第12/612912号に対する優先権を主張し、また、米国特許法119(e)に基づき、2004年9月23日に出願の米国仮出願第60/612468号、及び2005年6月30日に出願の米国仮出願第60/696353号の優先権の利益を主張し、出典明記によりその内容全体を援用するものである。

20

【技術分野】**【0002】**

本発明は、一般に反応性システイン残基で改変された抗体、より具体的には治療適用又は診断適用を有する抗体に関する。システイン改変抗体は、化学療法薬、毒素、ビオチンなどの親和性リガンド、放射性同位元素及び蛍光物質などの検出標識と結合させることができる。また、本発明は、哺乳動物細胞又は関連する病理学的状態の、インビトロ、インサイツ、及びインビボでの診断又は治療のための抗体及び抗体-薬物結合体化合物を使用する方法に関する。

30

【背景技術】**【0003】****(発明の背景)**

分子イメージングは、新規医薬品の開発及び評価における重要なツールである。免疫陽電子放射断層撮影(Immuno-PET)は、インビボでモノクローナル抗体(mAb)を追跡し定量化するために、PETの高感度性をモノクローナル抗体の高い特異性と効率的に組み合わせた急速に現れた方法である。Immuno-PETは、「生体内における包括的な免疫組織化学的染色」を提供する非侵襲的な診断のための臨床的方法の選択肢となることを目指している(van Dongen GA, et al. "Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications" Oncologist 2007;12:1379-89)。ImmunoPETは、標的特異的分子に結合されるべき陽電子放出放射性同位体を必要とするため、分子の生物学的半減期を放射性核種の半減期と一致させることが不可欠である(Verel I, et al. "The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy" J Nucl Med 2005;46 Suppl 1:164S-71S)。抗体(~150kDa)は数日から数週間にわたる半減期を持っているが、イメージングは、通常、抗体ベースのトレーサー投与後2から6日で最大のターゲット対バックグラウンド比を提供し、⁸⁹Zr及び¹²⁴I(それぞれ半減期が3.3日及び4.2日)などの放射性同位元素の使用を求めている。残念ながら、容易に入手できる⁶⁴Cuの半減期(12.7時間)は、この時間枠の中で良好なコントラストを持つ画像を与えるためには短すぎる。

40

50

【0004】

MABのテンプレート(Immuno-PET)からの陽電子放射断層撮影(PET)イメージング剤の開発は、分子標的を局所化して定量化するためのツールとしての期待でき、病理学的状態の非侵襲的な臨床診断を強化させることができる(van Dongen et al (2007) Oncologist 12;1379-89; Williams et al (2001) Cancer Biother Radiopharm 16:25-35; Holliger et al (2005) Nat Biotechnol 23:1126-36)。PETは疾患の検出のためには用いられる分子イメージング技術である。PETイメージングシステムは、患者の組織中の陽電子放出同位体の分布に基づいて画像を作成する。同位体は、典型的には、例えは体内で容易に代謝されるか又は局在している分子(例えはグルコース)に共有結合性に結合しているか又は体内のレセプター部位に化学的に結合したF-18、C-11、N-13又はO-15等の陽電子放出同位体を含むプローブ分子の注入により患者に投与される。いくつかのケースでは、同位体は、イオン溶液として、または吸入によって患者に投与される。Fab抗体断片(50kDa)またはダイアボディなどの小さなimmuno-PETイメージング剤、55kDaのFabの共有結合性に結合したV_H-V_L領域のペア2量体は、短い循環半減期、高い組織透過性を示し、注射後2~4時間の間にバックグラウンド比に対して最適な腫瘍に到達するため特に有用であり得、広く入手可能な¹ ⁸F(109.8分)などの短い半減期の同位体の利用を促進している。10

【0005】

ヨウ素124(¹²⁴I)を抗体3F9に結合させ、神経芽細胞腫の放射免疫療法のための線量を推定するために使用されている(Larson SM, et al "PET scanning of iodine-124-3F9 as an approach to tumor dosimetry during treatment planning for radioimmunotherapy in a child with neuroblastoma" J Nucl Med 1992;33:2020-3)。その後、より洗練されたPET計測手段及び放射性ヨウ素化するための改良技術が現れたため、¹²⁴Iは、多くのimmuno-PET研究で採用された(Verel I, et al "High-quality 124I-labelled monoclonal antibodies for use as PET scouting agents prior to 131I-radioimmunotherapy" European journal of nuclear medicine and molecular imaging 2004;31:1645-52; Lee FT et al "Immuno-PET of human colon xenograft-bearing B ALB/c nude mice using 124I-CDR-grafted humanized A33 monoclonal antibody" J Nucl Med 2001;42:764-9; Sundaresan G, et al. "124I-labeled engineered anti-CEA antibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice" J Nucl Med 2003;44:1962-9; Jain M and Batra SK. "Genetically engineered antibody fragments and PET imaging: a new era of radioimmunodiagnosis" J Nucl Med 2003;44:1970-2; Gonzalez Trotter DE et al. "Quantitation of small-animal (124)I activity distributions using a clinical PET/CT scanner" J Nucl Med 2004;45:1237-44; Robinson MK, et al. "Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody" Cancer Res 2005;65:1471-8; Jayson GC et al. "Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies" J Natl Cancer Inst 2002;94:1484-93; Divgi CR, et al. "Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (124I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial" Lancet Oncol 2007;8:304-10)。モノクローナル抗体(mAb)に¹²⁴Iを結合するための可能な比較的単純な放射性ヨウ素化技術にもかかわらず、重要な制限事項が、この放射性核種の広範な前臨床的使用を遅らせている。特に、複雑な崩壊方式は小動物のmicroPETの分解能に負の影響を与えるエネルギー性の陽電子(⁺最大、1.5及び2.1MeV)を含む。さらに、内在化ヨウ素化タンパク質が酵素的に脱ヨード化を受け、遊離のヨウ化物が標的細胞から急速に除去され、実際のモノクローナル抗体の取り込みを反映していないPET画像を与える(Perera RM et al. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor rece20304050

ptor antibody" *Neoplasia* (New York, N.Y 2007;9:1099-110)。^{8 9} Zrの使用は、⁸ ⁹ Zr崩壊 (⁺最大、897 keV) に放出される陽電子が¹⁸F及び¹¹Cに匹敵するmicroPET分解能(約1mm)を与えるためこれらの欠点を克服する。また、⁸ ⁹ Zr-mAbは内在の代謝物がリソソームの細胞内に捕捉され、実際のモノクローナル抗体の取り込みとPETイメージングとの優れた相関を与えている(van Dongen GA, et al. "Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications" *Oncologist* 2007;12:1379-89)。

【0006】

抗体に対して、標識、放射性同位元素、蛍光色素又は薬物成分を結合させる、すなわち共有結合を介して連結させる従来の手段は、一般的に標識成分が抗体上の数多くの部位で結合した分子の不均質な混合物を生じる。例えば、細胞傷害性薬物は、一般的に抗体のしばしば多数のリジン残基を介して抗体に結合し、不均質な抗体-薬物コンジュゲート混合物を生成する。反応条件に応じて、不均一な混合物は、通常、0からおよそ8、又はそれ以上の薬物成分が結合した抗体の分布を含む。さらに、抗体対薬物成分の特定の整数比を持つコンジュゲートの各サブグループ内においては、薬物成分が抗体上のさまざまな部位で結合している不均一な混合物である可能性がある。分析及び調製方法は、抱合反応に起因する不均一な混合物内における抗体-薬物コンジュゲート種の分子を分離し、特徴づけるには不十分である。抗体は、大きくて複雑で構造的に多様な生体分子であり、しばしば多くの反応性官能基を有する。リンカー試薬および薬物リンカー中間体との反応性は、pH、濃度、塩濃度、および共溶媒などの要因に依存する。更に、多段階の結合工程は、反応条件を制御し、及び反応物及び中間体を特徴づけるのが困難であるため再現できない場合がある。

【0007】

システインのチオールは、プロトン化してpH7付近で非求核性である多くのアミンとは異なり、中性pHで反応性である。遊離のチオール(RSH、スルフヒドリル)基は比較的反応性であるため、システイン残基を有するタンパク質は、しばしばジスルフィド結合オリゴマーとして酸化型で存在するか、又は内部に架橋されたジスルフィド基を有する。細胞外タンパク質は一般に遊離チオールを持たない(Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, at page 55)。タンパク質中の遊離チオールの量は、標準的なエルマンアッセイによって推定することができる。免疫グロブリンMは、ジスルフィド結合した五量体の例であるが、免疫グロブリンGは一緒にサブユニットを接着する内部のジスルフィド結合を持つタンパク質の例である。このようなタンパク質では、ジチオスレイトール(DTT)又セレノール等の試薬によるジスルフィド結合の還元は(Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156)、反応性の遊離のチオールを生成する必要がある。このアプローチでは、抗体の立体構造及び抗原結合特異性が失われる場合がある。

【0008】

抗体のシステインチオール基は、抗体のアミンまたはヒドロキシル基より、求電子抱合試薬に対して、一般により反応的、すなわちより求核性である。システイン残基が遺伝子工学的手法によりタンパク質に導入され、リガンドに対して共有結合を形成するか、または新しい分子内ジスルフィド結合を形成する(Better et al (1994) *J. Biol. Chem.* 269(13):9644-9650; Bernhard et al (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood et al (1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255; Tu et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4862-4867; Kanno et al (2000) *J. of Biotechnology*, 76:207-214; Chmura et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(15):8480-8484; 米国特許第6248564号)。しかし、タンパク質の種々のアミノ酸残基のシステインのアミノ酸への変異によりシステインチオール基を設計することは、特に不対(遊離Cys)残基、又は反応や酸化を比較的受けやすいであるものである場合、潜在的に問題がある。タンパク質の濃縮溶液においては、大腸菌のペリプラズム、培養上清にあろうが、又は部分的又は完全に精製したタンパク質であろうが、タンパク質の表面上の不対システイン残基は対をなして酸化し、分子

10

20

30

40

50

間ジスルフィドを形成し、従ってタンパク質の2量体又は多量体を形成することができる。ジスルフィド二量体形成は、薬物、リガンド、又は他の標識への結合のために新しいCysを非反応性にする。さらに、タンパク質が、新たに改変されたCysおよび既存のCys残基間に分子内ジスルフィド結合を形成する場合、両方のCys基は、活性部位への酸化及び相互作用に使用できない。また、タンパク質は誤った折り畳み又は三次構造の喪失によって、不活性化又は非特異的な状態にされる場合がある(Zhang et al (2002) *Anal. Biochem.* 311:1-9)。

【0009】

部位特異的結合は、結合部位から離れた部位の化学的修飾を可能にし、生物学的活性の完全保持を促進し、かつ追加された補欠分子族の可能な数の管理を可能とするため、ランダムなアミノ酸改変より好まれる。システイン改変抗体は、Fab抗体フラグメント(*thi o Fab*)として設計され、全長でIgGモノクローナル(*thi o Mab*)抗体として発現される。米国特許第7521541号; Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" *J Immunol Methods* 2008;332:41-52; Junutula JR et al. "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index" (2008) *Nat Biotechnol.* 26:925-32を参照し、その内容は参照により援用される。*Thi o Fab*及び*Thi o Mab*抗体はチオール反応性リンカー試薬および薬物リンカー試薬を用いて新たに導入されたシステインのチオール基でリンカーを介して接合され、抗MUC16(米国特許出願公開第2008/0311134号)、抗CD22(米国特許出願公開第2008/0050310号)、抗ROBO4(米国特許出願公開第2008/0247951号)、抗TENB2(米国特許出願公開第2009/0117100号)、抗CD79B(米国特許出願公開第2009/0028856号、米国特許出願公開第2009/0068202号)チオADCを含む、抗癌特性を持つシステイン改変抗体薬物複合体(チオADC)を調製する。

【発明の概要】

【0010】

本発明の化合物は、親抗体の1つまたは複数のアミノ酸が遊離システインアミノ酸で置換されているシステイン改変抗体を含む。システイン改変抗体は、チオール反応性値を0.6から1.0の範囲に有する1つ以上の遊離システインアミノ酸を含む。遊離システインアミノ酸は、親抗体中に改変される、ジスルフィド結合の一部ではないシステイン残基である。

【0011】

システイン改変抗体は、癌の診断及び治療において有用であり、かつ細胞表面及び膜貫通型レセプターに特異的な抗体、及び腫瘍関連抗原(TAA)を含み得る。そのような抗体はネイキッド抗体(薬物又は標識の成分に対して非結合型)または抗体-ジルコニウムコンジュゲート(AZC)として使用することができる。

【0012】

システイン改変抗体を調製しスクリーニングする方法の実施態様は、親抗体が抗体断片、例えばhu4D5Fabv8等である場合を含む。親抗体はまた、アルブミン結合ペプチド配列(ABP)を含む融合タンパク質であってもよい。親抗体はまた、huMab4D5-1、huMab4D5-2、huMab4D5-3、huMab4D5-4、huMab4D5-5、huMab4D5-6、huMab4D5-7及びhuMab4D5-8(トラスツズマブ)から選択されるヒト抗体であってもよい。

【0013】

本発明のシステイン改変抗体は、部位特異的でかつ効率的にチオール反応性試薬と結合しうる。チオール反応性試薬は、放射性同位体試薬、多機能リンカー試薬、キャプチャーベル試薬、蛍光試薬、又は薬物-リンカー中間体であり得る。

【0014】

システイン改変抗体は、固相支持体上に固定化され及び/又は薬物成分を結合させた検

10

20

30

40

50

出可能な標識で標識され得る。

【0015】

本発明の別の態様は、ジルコニウム標識された、システイン改変抗体であり、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びジルコニウム錯体 (Z) へ結合するシステイン改変抗体 (Ab) を含み、式 I を有する：



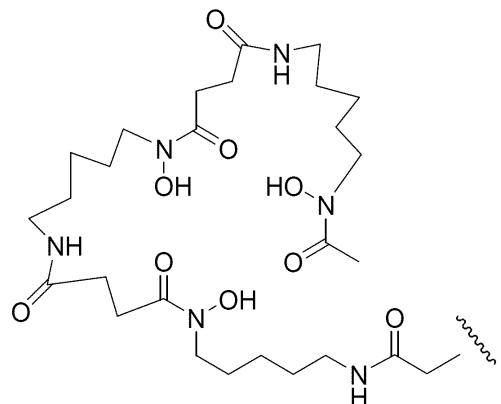
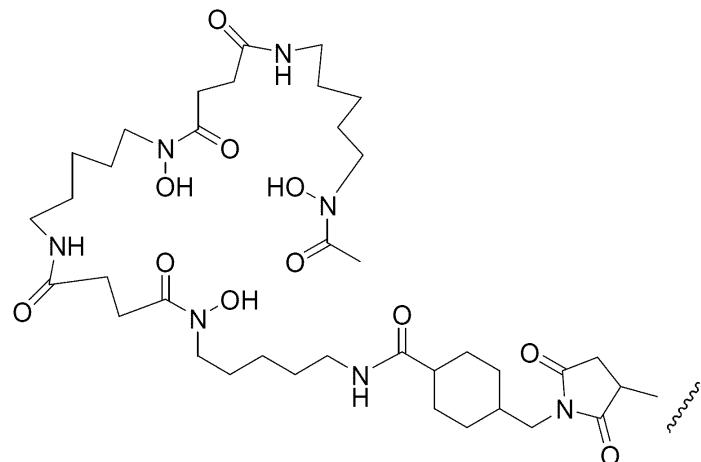
ここで p は 1 から 4 である。

【0016】

本発明の別の態様は、デスフェリオキサミン標識された、システイン改変抗体であり、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (Df) へ結合するシステイン改変抗体 (Ab) を含み、式 II を有する：



ここで $L - Df$ は、



から選択され、ここで波線は抗体 (Ab) への結合を示し、及び p は 1 から 4 である。

【0017】

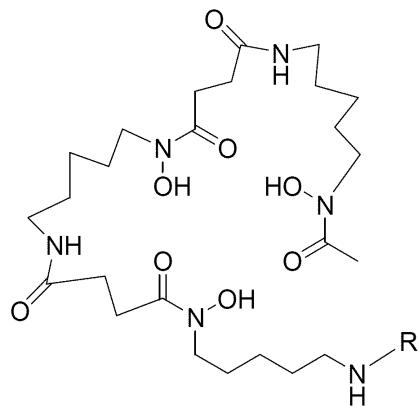
本発明の別の態様は、次の構造

10

20

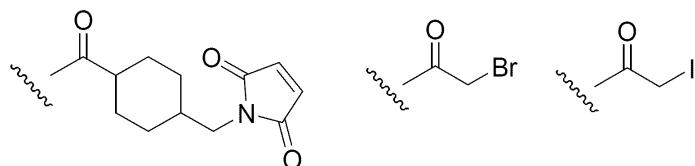
30

40



10

から選択されたデスフェリオキサミン標識試薬であり、
ここで R は



20

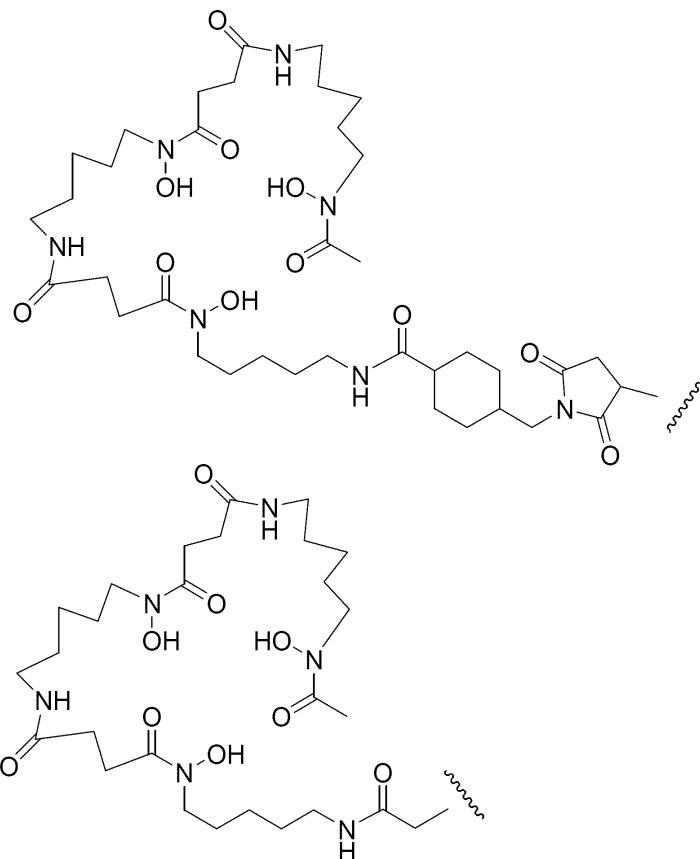
から選択される。

【 0 0 1 8 】

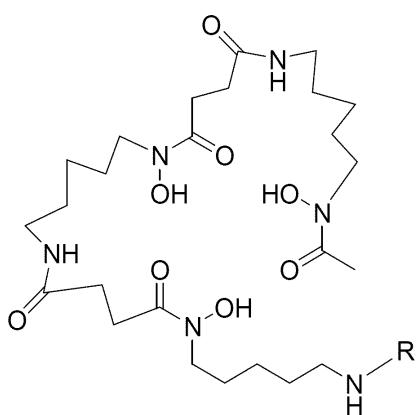
本発明の別の態様は、デスフェリオキサミン標識された、システイン改変抗体を作る方法であり、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (D f) へ結合するシステイン改変抗体 (A b) を含み、式 II を有する：



ここで L - D f は、

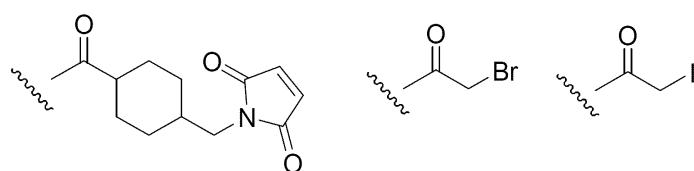


から選択され、ここで波線は抗体 (Ab) への結合を示し、及び
p は 1 から 4 であり、
本方法は、次の構造



から選択された組成物を反応させることを含み、
ここで R は

40



から選択され、一以上の遊離システインアミノ酸を有するシステイン改変抗体を持ち、それによって、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体が形成される。

【0019】

本発明の別の態様は、ジルコニウム標識された、システイン改変抗体を作る方法であり

50

、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びジルコニウム錯体 (Z) へ結合するシステイン改変抗体 (A b) を含み、式 I を有し、



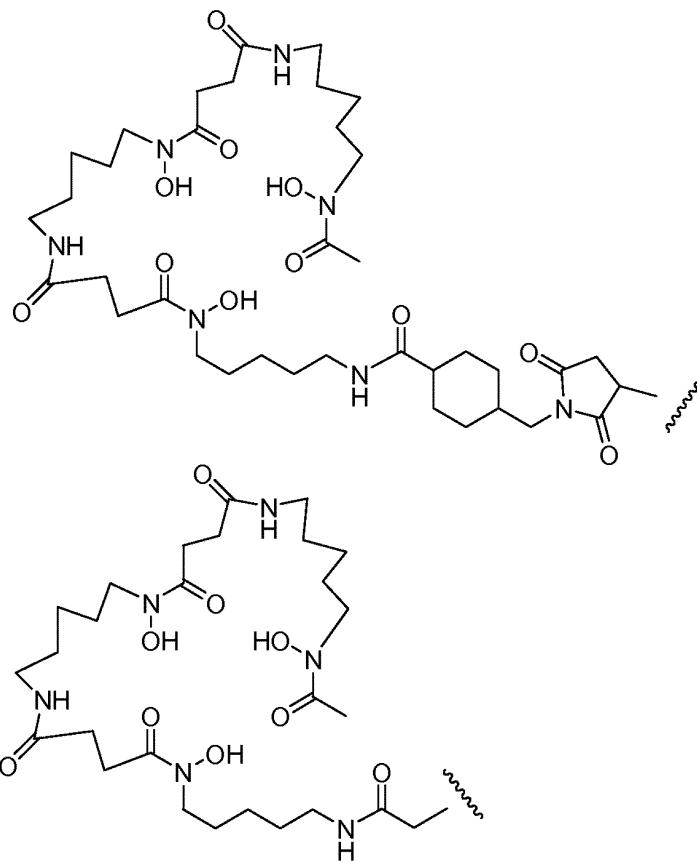
ここで p は 1 から 4 であり、

本方法は、ジルコニウム試薬とデスフェリオキサミン標識された、システイン改変抗体との錯体形成を含む方法であり、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (D f) へ結合するシステイン改変抗体 (A b) を含み、式 II を有し、

10



ここで $L - D f$ は、



20

から選択され、ここで波線は抗体 (A b) への結合を示し、及び p は 1 から 4 であり、

それによって、デスフェリオキサミン標識された、システイン改変抗体が形成される。

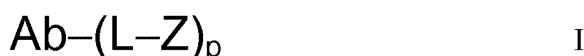
【 0 0 2 0 】

30

本発明の別の態様は、イメージングの方法であり、

動物へジルコニウム標識されたシステイン改変抗体を投与すること、及びイメージングによりジルコニウム標識された、システイン改変抗体の存在をインビボで検出することを含み、

ここで、ジルコニウム標識されたシステイン改変抗体は、リンカー (L) を介して一以上のジルコニウム錯体 (Z) と結合した一以上の遊離システインアミノ酸を持つシステイン改変抗体 (A b) を含み、かつ式 I を有し、



40

50

ここで p は 1 から 4 である。

【0021】

本発明の別の態様は、本明細書に開示される化合物及び組成物の診断への適用が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】図1Aは、X線結晶座標に由来する $h u 4 D 5 F a b v 7$ 抗体断片の三次元の表現を示す。重鎖及び軽鎖の例示的に改変された $C y s$ 残基の構造上の位置は（配列番号付け方に従って）番号が付けられている。

【図1B】図1Bは、 $4 D 5 v 7 f a b H$ の $K a b a t$ の番号付け方式（下段）と比較して、N末端で始まる配列番号付け方式（上段）を示す。 $K a b a t$ の番号付けの挿入はa、b、cにより記載される。

【図2A - 2B】図2A及び2Bは $h u 4 D 5 F a b v 8$ 及び $h u 4 D 5 F a b v 8$ の $C y s$ 変異（ $T h i o F a b$ ）ファージ変異体の吸光度の検出による結合測定を示す：BSA（空のバー）、HER2（縞のバー）又はストレプトアビジン（実線のバー）との相互作用に関する PHESELECTOR アッセイによる、（A）非ビオチン標識ファージ $h u 4 D 5 F a b v 8$ 及び（B）ビオチン標識ファージ $h u 4 D 5 F a b v 8$ 。

【図3A - 3B】図3A及び3Bは $h u 4 D 5 F a b v 8$ （左）及び $h u 4 D 5 F a b v 8$ の $C y s$ 変異（ $T h i o F a b$ ）変異体の $450 nm$ での吸光度の検出による結合測定を示す：BSA（空のバー）、HER2（縞のバー）又はストレプトアビジン（実線のバー）との相互作用に関する PHESELECTOR アッセイによる、（A）非ビオチン標識ファージ $h u 4 D 5 F a b v 8$ 及び（B）ビオチン標識ファージ $h u 4 D 5 F a b v 8$ 。軽鎖変異体は左側にあり、重鎖変異体は右側にある。チオール反応性 = ストレプトアビジン結合の $OD_{450 nm} \div HER2$ （抗体）結合の $OD_{450 nm}$ 。

【図4A】図4Aは野生型 $h u 4 D 5 F a b v 8$ の部分的表面接触性（Fractional Surface Accessibility）の値を示す。軽鎖の部位は左側にあり、重鎖の部位は右側にある。

【図4B】図4BはHER2（2日目）、ストレプトアビジン（SA）（2日目）、HER2（4日目）、及びSA（4日目）との相互作用に関するビオチン標識 $h u 4 D 5 F a b v 8$ （左）及び $h u 4 D 5 F a b v 8$ の $C y s$ 変異（ $T h i o F a b$ ）変異体の $450 nm$ での吸光度の検出による結合測定を示す。ファージ $h u 4 D 5 F a b v 8$ の $C y s$ 変異体が単離され、4で保存された。ビオチン抱合は、2日目又は4日目のいずれかで行われ、続いて PHESELECTOR 分析が行われ、実施例2に記載のように Her2 及びストレプトアビジンとの相互作用をモニタリングし、改変された $T h i o F a b$ 変異体の反応性チオール基の安定性を調べた。

【図5】図5はストレプトアビジン及びHER2への結合に関するビオチン-マレイミド結合- $h u 4 D 5 F a b v 8$ （A121C）及び非ビオチン標識化野生型 $h u 4 D 5 F a b v 8$ の $450 nm$ での吸光度の検出による結合測定を示す。各 $F a b$ は $2 ng$ 及び $20 ng$ で試験した。

【図6】図6はウサギアルブミン、ストレプトアビジン（SA）、及びHER2との結合に関する、ビオチン標識 ABP- $h u 4 D 5 F a b v 8$ 野生型（野生型（wt））、及び ABP- $h u 4 D 5 F a b v 8$ のシステイン変異体 V110C 及び A121C の $450 nm$ での吸光度の検出による ELIZA 分析を示す。

【図7】図7はウサギアルブミン、HER2 及びストレプトアビジン（SA）との結合、および $F a b$ -HRP 又は SA-HRP での探索に関して、ビオチン標識 ABP- $h u 4 D 5 F a b v 8$ システイン変異体（ $T h i o F a b$ 変異体）：（左から右へ）単一の $C y s$ 変異体 ABP-V110C、ABP-A121C、二重の $C y s$ 変異体 ABP-V110C-A88C 及び ABP-V110C-A121C の $450 nm$ での吸光度の検出による ELIZA 分析を示す。

【図8】図8はビオチン標識 $T h i o F a b$ ファージ及び抗ファージ HRP 抗体の HER2（上）及びストレプトアビジン（下）に対する結合を示す。

10

20

30

40

50

【図13A】図13Aは、吸光度を検出するためにH R P標識二次抗体の結合を伴ったビオチン化抗体が、固定化したH E R 2へ結合する模式図を示す。

【図13B】図13Bは、固定化されたH E R 2への結合におけるビオチン-マレイミド抱合チオトラスツズマブ変異体及び非ビオチン標識化野生型トラスツズマブの450nmでの吸光度の検出による結合測定を示す。左から右に：V110C（単一C y s）、A121C（単一C y s）、V110C/A121C（二重C y s）、及びトラスツズマブ。各チオI g G変異体及びトラスツズマブは1ng、10ng、及び100ngで試験された。

【図14A】図14Aは、吸光度を検出するためにビオチンが抗I g G-H R Pへ結合し、固定化したH E R 2へ結合するビオチン標識化抗体の模式図を示す。

10

【図14B】図14Bは、固定化されたストレプトアビシンに対する結合における、ビオチン-マレイミド抱合チオトラスツズマブ変異体及び非ビオチン標識化野生型トラスツズマブの450nmでの吸光度の検出による結合測定を示す。左から右へ：V110C（単一C y s）、A121C（単一C y s）、V110C/A121C（二重C y s）、及びトラスツズマブ。各チオI g G変異体及びトラスツズマブは1ng、10ng、及び100ngで試験された。

【図15】図15は、抱合のために細胞培養から発現されたシステイン改変抗体（T h i o M a b）を調製するための一般的な方法を示す。

【図16】図16は、2H9 T h i o M a bのF c変異体の非還元（上）及び還元（下）変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析（左から右に、レーン1-9）を示す：固定化されたプロテインA上で精製後のA339C；S337C；S324C；A287C；V284C；V282C；V279C；V273C及び2H9野生型。右側のレーンは、サイズマーカーラダーであり、インタクトなタンパク質が約150kDa、約50kDaの重鎖断片及び約25kDaの軽鎖断片であることを示す。

20

【図17A】図17Aは、2H9 T h i o M a b変異体の非還元（左）及び還元（+D T T）（右）変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析（左から右に、レーン1-4）を示す：固定化されたプロテインA上で精製後のL-V15C；S179C；S375C；S400C。

【図17B】図17Bは、固定化されたプロテインA上で精製後の2H9及び3A5 T h i o M a b変異体の非還元（左）及び還元（+D T T）（右）変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を示す。

30

【図18B】図18Bは、ビオチン標識化チオ-I g G変異体のウェスタンプロット分析を示す。2H9及び3A5 T h i o M a b変異体は、還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析され、タンパク質はニトロセルロース膜に移された。抗体及び抱合ビオチンの存在は、それぞれ、抗I g G-H R P（上）及びストレプトアビシン-H R P（下）により探索された。レーン1：3A5 H-A121C、レーン2：3A5 L-V110C、レーン3：2H9 H-A121C、レーン4：2H9 L-V110C、レーン5：2H9野生型。

【図19】図19は、抗I g G-H R Pで探索し及び450nmでの吸光度を測定することによる、ストレプトアビシンに対するビオチン標識化2H9変異体の結合に関するE L I S A分析を示す（上の棒図表）。下の模式図は、E L I S A分析で用いた実験デザインを示す。

40

【図20】図20は、キレート剤⁸⁹ZrデスフェリオキサミンB（D f，上）をアミノ反応性リンカーのT F P - N - S u c D f及びD f - B z - N C S（中央）及びチオールリンカーナのD f - C h x - M a l、D f - B a c、及びD f - l a c（下）を用いて、タンパク質に結合させるための二官能性試薬を示す。

【図21】図21はD f - C h x - M a l、D f - B a c、D f - I a cの調製及びF a bの重鎖に組込まれたC y s残基を介してチオトラスツズマブへの結合を示す。反応条件；i . D I E A , D M F / H₂O (10:1) , R T , 0 . 5 - 1 時間；i i . D I E A , D M F , 0 , 4 時間；i i i . p H 7 . 5 , R T , 1 時間；i v . p H 9 , R T , 5 時間

50

; v. pH 9, RT, 2 時間。

【図22】図22は、ジルコニウム-89シウ酸塩の、デスフェリオキサミン標識化されたシステイン改変抗体、例えば4つのリンカーとしてN-Suc、Bz-SCN、Chx-マレイミド(Chx-Mal)、又はアセチル(Ac)を含むDfリンカートラスツズマブの変異体等とのキレート化を示す。

【図23】図23は、軽鎖及び重鎖から別々のシグナルを示す還元された抗体の質量分析を示す。A:チオ-トラスツズマブ、B:Df-Ac-チオ-トラスツズマブ(Df-Bacを使用)、及びC:Df-Ac-チオ-トラスツズマブ(Df-Iacを使用)、及びD:Df-Chx-Mal-チオ-トラスツズマブ。

【図24】図24は37におけるマウス血清中の⁸⁹Zr-Chx-Malチオ-トラスツズマブ(白まる)及び⁸⁹Zr-Df-Acチオ-トラスツズマブ(黒まる)の安定性を示す(n=3)。

【図25】図25は、4つの異なるリンカー(Bz-SCN、N-Suc、Chx-Mal、及びAc)を用いて調製された⁸⁹Zr-トラスツズマブの100μCiを尾静脈ボラス注入後96時間後に得られた代表的な全身の画像(最大強度の投影)を示す。

【図26】図26はPETにより測定された注射後24時間、96時間及び144時間において選択された組織におけるインビボでの取込みを示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

典型的な実施態様の詳細な記述

10

20

参照は本発明の所定の実施態様に対して詳細になされ、その実施例は添付の構造や数式に示される。本発明は、列挙された実施態様と一緒に説明されるが、それらはそれらの実施態様に本発明を限定することを意図していないことが理解されるであろう。逆に本発明は、全ての代替物、修正、及び等価物を包含することを目的としており、それらは特許請求の範囲によって定義されているように、本発明の範囲内に含まれ得る。

【0024】

当業者は、本明細書に記載と類似または同等の多くの方法および材料を認識し、それらは本発明の実施において使用することができる。本発明は、記載された方法や材料に少しも限定されるものではない。

【0025】

30

特に定義しない限りは、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を持ち、Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New Yorkと一致する。

【0026】

定義

特に断りのない限り、本明細書で使用される以下の用語および語句は以下の意味を持つように意図されている:

商標名が本明細書で使用されている場合、申請者は独立して商品名の製品製剤、ジェネリック医薬品、及び商号製品の医薬品有効成分を含めることを意図する。

40

【0027】

本明細書における「抗体」なる用語は最も広い意味で用いられ、特に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、2量体、多量体、多特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び、望ましい生物学的活性を提示する限りにおいて抗体断片を包含する(Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861)。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、又は他の種由来のものであってよい。抗体は、特異的な抗原を認識して結合することができる免疫系によって生成されるタンパク質である。(Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York)。標的抗原は一般に、エピトープとも呼ばれ、複数の抗体上のCDRによって認識される多数の結合部位を有する。

50

異なるエピトープに特異的に結合する各々の抗体は異なる構造を有する。よって、1つの抗原は1より多い対応する抗体を有しうる。また、抗体は、完全長免疫グロブリン分子又は完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な成分、すなわち限定するものではないが、癌細胞又は自己免疫性疾患と関連した自己免疫抗体を産生する細胞を含む標的などの対象の標的の抗原ないしその一部を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を含む。本明細書において開示される免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子のいずれかのタイプ(例えばIgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA)、クラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)又はサブクラスのものであってよい。免疫グロブリンは任意の種から得られてよい。一態様では、しかしながら、免疫グロブリンは、ヒト、マウス又はウサギ起源のものである。

10

【0028】

「抗体断片」には、完全長抗体の一部、一般に抗原結合又はその可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ；線状抗体；ミニボディ(Olafsen et al (2004) *Protein Eng. Design & Sel.* 17(4):315-323)；Fab発現ライブラリーによって生産される断片、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、CDR(相補性決定領域)、ECD(細胞外ドメイン)、及び癌細胞抗原、ウイルス抗原又は微生物抗原、単鎖抗体分子に免疫特異的に結合する上記の何れかのエピトープ結合断片；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

【0029】

本明細書における「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる天然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体の実質的に均一な集団から得られている抗体の性質を表すものであって、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、最初にKohler et al (1975) *Nature* 256:495により記載されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号、米国特許第5807715号を参照)によって作られてもよい。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

20

【0030】

本明細書中におけるモノクローナル抗体には特に、特定の種由来または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列に同一又は相同である重鎖及び/又は軽鎖の一部を含み、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、他の種由来または他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体並びに該抗体の抗体断片の対応する配列に同一又は相同である「キメラ」抗体が含まれる(米国特許第4816567号；及びMorris et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855)。本明細書で対象とするキメラ抗体には、非ヒト靈長類(例えば旧世界ザル、サルなど)及びヒト定常領域配列由來の可変ドメイン抗原結合配列を含む「靈長類化」抗体が含まれる。

30

【0031】

本明細書における「インタクトな抗体」は、VL及びVHドメイン、並びに軽鎖定常ドメイン(CL)及び重鎖定常ドメイン、CH1、CH2及びCH3を含むものである。定常ドメインは、天然型配列の定常ドメイン(例えばヒト天然型配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であってもよい。インタクトな抗体は、抗体のFc領域(天然型配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因する生物活性を意味する一又は複数の「エフェクター機能」を有してよい。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合；補体依

40

50

存性細胞障害作用；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(ADC)；食作用；及び細胞表面レセプター(例えばB細胞レセプター；BCR)の下方制御などが含まれる。

【0032】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体は異なる「クラス」に分類できる。インタクトな抗体の五つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更に「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれγ、δ、ε及びμと称される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。¹⁰ Igの形態にはヒンジを修飾した型又はヒンジ欠損型を含む(Roux et al (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; 米国特許出願公開第2005/0048572号；米国特許出願公開第2004/0229310号)。

【0033】

「Erbbレセプター」は、Erbbレセプターファミリーに属するレセプタープロテインキナーゼであり、そのメンバーは細胞増殖、分化及び生存の重要なメディエーターである。Erbbレセプターファミリーは上皮成長因子レセプター(EGFR、Erbb1、HER1)、HER2(ErbB2又はp185neu)、HER3(ErbB3)及びHER4(ErbB4又はtyro2)を含む4つの異なるメンバーを含む。抗Erbb2抗体のパネルは、ヒト乳癌細胞株SKBR3を使用して特徴づけられている(Hudziak et al (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172)。最大阻害は細胞増殖を56%抑制した4D5と呼ばれる抗体で得られた。パネル内の他の抗体は、このアッセイにおいて、細胞増殖をより少い程度で減少させた。抗体4D5は更に、TNF-²⁰ (米国特許第5677171号)の細胞傷害効果に対してErbb2過剰発現乳癌細胞株を感作することが見いだされた。Hudziakらによって議論された抗Erbb2抗体は、更にFendly et al (1990) *Cancer Research* 50:1550-1558; Kotts et al. (1990) *In Vitro* 26(3):59A; Sarup et al. (1991) *Growth Regulation* 1:72-82; Shepard et al. J. (1991) *Clin. Immunol.* 11(3):117-127; Kumar et al. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986; Lewis et al. (1993) *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263; Pietras et al. (1994) *Oncogene* 9:1829-1838; Vitetta et al. (1994) *Cancer Research* 54:5301-5309; Sliwkowski et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665; Scott et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:14300-5; D'souza et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:7202-7206; Lewis et al. (1996) *Cancer Research* 56:1457-1465; and Schaefer et al. (1997) *Oncogene* 15:1385-1394において特徴付けられる。³⁰

【0034】

Erbbレセプターは、一般的に、細胞外ドメインを含み、それはErbbリガンド、親油性の膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン、及びリン酸化可能な幾つかのチロシン残基を保有するカルボキシ末端シグナル伝達ドメインを結合し得る。Erbbレセプターは「天然配列」Erbbレセプター又はその「アミノ酸配列変異体」であってもよい。好ましくは、Erbbレセプターは、天然配列のヒトのErbbレセプターである。従って、「Erbbレセプターファミリーのメンバー」はEGFR(ErbB1)、Erbb2、Erbb3、Erbb4、又は現在知られているか又は将来に同定される任意の他のErbbレセプターである。⁴⁰

【0035】

「Erbb1」、「上皮成長因子レセプター」、「EGFR」及び「HER1」という用語は本明細書において互換的に使用され、例えばCarpenter et al (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56:881-914に開示されているようなEGFRを指し、その自然発生突然変異体(例えば、Humphrey等, *PNAS(USA)* 87:4207-4211(1990)に記載されているような欠失変異体EGFR)を含む。Erbb1なる用語は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子⁵⁰

を指す。HER 1に対する抗体は例えばMurthy et al (1987) Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560、及び国際公開第95/25167号に記載されている。

【0036】

「ERRP」、「EGFRレセプター関連タンパク質」、「EGFR関連蛋白質」及び「上皮成長因子レセプター関連タンパク質」は本明細書中で互換的に使用され、例えば、米国特許第6399743号、米国特許出願公開第2003/0096373号に開示されているERRPを指す。

【0037】

「Erbb2」及び「HER2」なる表記は、ここで互換的に使用され、例えば、Semba et al (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6497-6501及びYamamoto et al (1986) Nature, 319:230-234 (Gene bank受託番号X03363)に記載されているヒトHER2タンパク質を指す。「erbb2」なる用語は、ヒトErbb2をコードする遺伝子を指し、「neu」はラットp185neuをコードする遺伝子を指す。好ましいErbb2は天然配列ヒトErbb2である。

【0038】

「Erbb3」及び「HER3」は、例えば米国特許第5183884号、同第5480968号、及びKraus et al (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:9193-9197に開示されている。Erbb3に対する抗体は当該技術分野で公知であり、例えば米国特許第5183884号、同5480968号及び国際公開第97/35885号に記載されている。

10

【0039】

「Erbb4」及び「HER4」なる用語は本明細書において、例えば欧洲特許第599274号；Plowman et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750；及びPlowman et al (1993) Nature 366:473-475、そのアイソフォームを含むものは、例えば国際公開第99/19488号に開示される。HER4に対する抗体は、例えば、国際公開第02/18444号に記載される。

【0040】

Erbbレセプターに対する抗体は、例えばサンタクルスバイオテクノロジー社、米国カリフォルニア州を含むいくつかの供給源から市販されている。

20

【0041】

「アミノ酸配列変異体」という用語は、天然配列ポリペプチドから或る程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。通常、アミノ酸配列変異体は天然のErbbリガンドの少なくとも1つのレセプター結合ドメインと又は天然のErbbレセプターの少なくとも1つのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%の相同性を有しており、好ましくは該レセプター又はリガンド結合ドメインと少なくとも約80%、さらに好ましくは少なくとも約90%の相同性を有している。アミノ酸配列変異体は、天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内の或る位置において、置換、欠失及び/又は挿入を有している。アミノ酸は、通常の名前、1文字及び3文字のコードで指定される。

30

【0042】

「配列同一性」は、配列を整列し、最大のパーセント配列同一性を達成するために、必要に応じてギャップを導入した後における、同一のアミノ酸配列変異体の残基の割合として定義される。整列するための方法及びコンピュータプログラムは、当技術分野において周知である。そのようなコンピュータプログラムの一つは、ジェネンテック社により著され1991年12月10日に米国著作権局(ワシントンD.C.20559)にユーザーマニュアルとともに提出された、「Alignn2」である。

40

【0043】

「抗体依存性細胞媒介性障害活性」及び「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)を発現する非特異的細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞を溶解する細胞媒介性反応を意味する。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcR IIIのみを

50

発現する一方、単球は Fc RI、Fc RII 及び Fc RIII を発現する。造血性細胞での FcR の発現は、Ravetch and Kinet, (1991) "Annu. Rev. Immunol." 9:457-92 の 464 頁の表 3 に要約されている。対象分子の ADC C 活性を評価するためには、米国特許第 5500362 号又は 5821337 号に記載されているようなインビトロ ADC C アッセイが実施されうる。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK)細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子の ADC C 活性は、例えば、Clynes et al (1998) PROC. NAT. ACAD. SCI. (USA) 95:652-656 に開示されたような動物モデルにおいて、インビトロで評価されうる。

【0044】

10

「ヒトエフェクター細胞」は、一又は複数の FcRs を発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。好ましくは、その細胞が少なくとも Fc RIII を発現し、ADC C エフェクター機能を実行する。ADC C を媒介するヒト白血球の例には、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性 T 細胞及び好中球が含まれるが、PBMC と NK 細胞が好ましい。エフェクター細胞は、その天然源、例えば血液又は本明細書に記載の PBMC から単離され得る。

【0045】

「Fc レセプター」又は「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合するレセプターを記載するため使用される。好適な FcR は、天然配列ヒト FcR である。さらに好適な FcR は、IgG 抗体(レセプター)に結合し、Fc RI、Fc RII 及び Fc RIII サブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。Fc RIIA(「活性化レセプター」)及び Fc RIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプター Fc RIIA は、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプター Fc RIIB は、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997) 参照)。FcR は Ravetch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel ら, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及び de Haas ら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) において概説されている。将来同定されるものも含む他の FcR が、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性 IgG の移動の原因である新生児レセプター FcRn もまた含む(Guyer ら, J. Immunol. 117:587(1976) 及び Kim ら, J. Immunol. 24:249 (1994))。

20

【0046】

30

「補体依存性細胞障害」又は「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力を意味する。補体活性化経路は補体系(C1q)の第 1 成分が、同族抗原と結合した分子(例えば抗体)に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDC アッセイを、例えば Gazzano-Santoro ら, J. Immunol. Methods 202:163(1996) に記載されているようにして実施することができる。

【0047】

40

「天然抗体」は、通常、2 つの同一の軽(L)鎖及び 2 つの同一の重(H)鎖からなる約 150000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、その他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

【0048】

50

「可変」なる用語は、可変ドメインのある部位が、抗体間で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する3つの高頻度可変領域により連結された

シート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞媒介性障害活性(ADC)への抗体の関与を示す。

【0049】

本明細書で使用されるところの「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合に寄与する抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)、及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及び/又は「高頻度可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J.Mol.Biol. 196:901-917(1987))を含む。「フレームワーク」又は「FR」残基はここで定義するように高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0050】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')2断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を架橋することができる。

【0051】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0052】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')2抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0053】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0054】

10

20

30

40

50

「一本鎖 F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F v ポリペプチドは V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは s c F v が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F v の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) の Plueckthun を参照のこと。抗 E r b B 2 抗体の s c F v 断片は国際公開第 93/16185 号; 米国特許第 5571894 号、及び同 5587458 号に記載されている。

【0055】

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を意味し、その断片は同一のポリペプチド鎖 (V_H - V_L) 内で軽鎖可変ドメイン (V_L) に重鎖可変ドメイン (V_H) が結合してなる。短すぎて同一鎖上で二つのドメインの対形成が可能でないリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許出願公開第 404,097 号; 国際公開第 93/11161 号; 及び Hollinger ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) により詳細に記載されている。

【0056】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化は、非免疫原性ヒト抗体のアクセプターにネズミの抗原結合情報を転送する方法であり、多くの治療的に有用な薬剤をもたらした。ヒト化の方法は、一般に全ての 6 つのマウス相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体のフレームワーク上に転送することによって開始される (Jones et al, (1986) Nature 321:522-525)。これらの CDR 移植抗体は、一般的に抗原結合について元の親和性を保持せず、実際には親和性はしばしば著しく損なわれている。CDR に加えて、選択非ヒト抗体のフレームワーク残基はまた、適切な CDR の立体構造を維持するために組み込む必要がある (Chothia et al (1989) Nature 342:877)。グラフトされた CDR の構造のコンフォメーションをサポートするため、鍵となるマウスフレームワーク残基のヒトアクセプターへの転送は、抗原結合及び親和性を復元することが示されている (Riechmann et al (1992) J. Mol. Biol. 224: 487-499; Foote and Winter, (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; Presta et al (1993) J. Immunol. 151, 2623-2632; Werther et al (1996) J. Immunol. Methods 157:4986-4995; and Presta et al (2001) Thromb. Haemost. 85:379-389)。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 (FR) 残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全ての FR がヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones 等, Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann 等, Nature 332, 323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992) を参照のこと。

【0057】

「遊離したシステインアミノ酸」は、親抗体内に改変されているシステインアミノ酸残基を指し、チオール官能基 (-SH) を有し、分子内又は分子間ジスルフィド架橋として対形成しない。

【0058】

「チオール反応値」なる用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴

10

20

30

40

50

けである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、1の最大値に変換される。例えば、ビオチン・マレイミド試薬などのチオール反応試薬と100%の收率で反応してビオチン標識抗体を形成するシステイン改変抗体の遊離システインアミノ酸はチオール反応値が1.0となる。チオール反応試薬と80%の收率で反応する同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0.8となる。チオール反応試薬と完全に反応しない同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0となる。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、又は他の定量的な分析試験によって行ってもよい。

10

【0059】

「親抗体」は、一又は複数のアミノ酸残基が一又は複数のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然型又は野生型の配列を含んでいてもよい。親抗体は、他の天然型、野生型又は修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾(例えば付加、欠失及び/又は置換)を有してもよい。親抗体は、対象の標的抗原、例えば生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。また、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原；米国特許第5091178号を参照)に対する抗体も考慮される。

【0060】

典型的な親抗体は、細胞表面および膜貫通型レセプター及び腫瘍関連抗原(TAA)に対する親和性及び選択性を有する抗体を含む。

20

【0061】

他の典型的な親抗体は、抗エストロゲンレセプター抗体、抗プロゲステロンレセプター抗体、抗p53抗体、抗HER-2/neu抗体、抗EGFR抗体、抗カテプシンD抗体、抗Bc1-2抗体、抗E-カドヘリン抗体、抗CA125抗体、抗CA15-3抗体、抗CA19-9抗体、抗c-erbB-2抗体、抗P-糖蛋白質抗体、抗CEA抗体、抗網膜芽細胞腫蛋白質抗体、抗-ras癌タンパク質抗体、抗ルイスX抗体、抗Ki-67抗体、抗PCNA抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD5抗体、抗CD7抗体、抗CD8抗体、抗CD9/p24抗体、抗CD10抗体、抗CD11c抗体、抗CD13抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD19抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD23抗体、抗CD30抗体、抗CD31抗体、抗CD33抗体、抗CD34抗体、抗CD35抗体、抗CD38抗体、抗CD41抗体、抗LCA/CD45抗体、抗CD45RO抗体、抗CD45RA抗体、抗CD39抗体、抗CD100抗体、抗CD95/Fas抗体、抗CD99抗体、抗CD106抗体、抗ユビキチン抗体、抗CD71抗体、抗c-myc抗体、抗サイトケラチン抗体、抗ビメンチン抗体、抗HPV蛋白質抗体、抗軽鎖抗体、抗軽鎖抗体、抗メラノソーム抗体、抗前立腺特異抗原抗体、抗S-100抗体、抗タウ抗原抗体、抗フィブリン抗体、抗ケラチン抗体及び抗Tn-抗原抗体から選択されるものを含むがこれらに限定されない。

30

【0062】

「単離された抗体」とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって定量して95重量%以上まで、最も好ましくは99重量%以上まで、(2)スピニングカップシーカエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、又は(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え体細胞内のインサルツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

40

50

【0063】

分子標的又は目的とする抗原、例えばErbB2抗原を「結合する」抗体とは、抗体が抗原を発現する細胞を標的にすることにおいて有用であるよう十分な親和性でその抗原を結合することができるものである。抗体がErbB2のをバインドするものである場合、それは他のErbBレセプターとは対照的に、通常は優先的にErbB2を結合し、他のタンパク質、例えばEGFR、ErbB3又はErbB4などとは有意に交差反応しないものであり得る。そのような実施態様において、これらの非ErbB2タンパク質への抗体の結合（例えば、内因性レセプターへの細胞表面の結合）の程度は、蛍光活性化細胞分類（FACS）分析又は放射性免疫沈降法（RIA）によって決定されると10%未満となる。時には、例えば、Schecter et al. (1984) Nature 312:513及びDrebin et al (1984) Nature 312:545-548に記載されるように、抗ErbB2抗体がラットneuタンパク質と有意には交差反応しない場合がある。10

【0064】

本発明によって包含される抗体の標的分子は、CDタンパク質及びそのリガンド、例えば、限定されないが、(i) CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD22、CD34、CD40、CD79 (CD79a)、及びCD79 (CD79b)；(ii) ErbBレセプターファミリーのメンバー、例えばEGFレセプター、HER2、HER3又はHER4レセプター；(iii) LFA-1、Mac1、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM及びv/3インテグリンリンなどの細胞接着分子で、そのサブユニット又はサブユニットの何れかを含む（例えば、抗CD11a、抗CD18又は抗CD11b抗体）；(iv) VEGFなどの増殖因子；IgE；血液型抗原；flik2/filt3レセプター；肥満(OB)レセプター；mp1レセプター；CTLA-4、プロテインC、BR3、c-met、組織因子、7など、及び(v)細胞表面及び膜貫通の腫瘍関連抗原(TAA)を含む。20

【0065】

特に示されなければ、「モノクローナル抗体4D5」という用語は、マウス4D5抗体(ATCC CRL10463)の、又は該抗体由来の抗原結合残基を有する抗体を指す。例えば、モノクローナル抗体4D5はマウスモノクローナル抗体4D5又はその変異体、例えばヒト化4D5であってもよい。典型的なヒト化4D5抗体は米国特許第5821337号に記載されているように、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7及びhuMAb4D5-8を含む。30

【0066】

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドを、ファージ、例えば糸状ファージ粒子の表面上のコートタンパク質への融合タンパク質としてディスプレイする技術である。ファージディスプレイの有用性は、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリーを、高親和性でもって標的分子に結合する配列について迅速にかつ効率的に選別できるという点にある。ファージ上へのペプチド及びタンパク質ライブラリーのディスプレイは、特異的結合特性を持つものについて何百万ものポリペプチドをスクリーニングするために使用されている。多価ファージディスプレイ法は、典型的には糸状ファージのpIII又はpVIIへの融合体を通してランダム小ペプチド及び小タンパク質をディスプレイするため使用されている(Wells及びLowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 (1992)と、そこで引用されている文献)。一価ファージディスプレイでは、タンパク質又はペプチドライブラリーはファージコートタンパク質又はその一部に融合させられ、野生型遺伝子IIIタンパク質の存在下で低レベルで発現される。選別が内因的なリガンド親和性に基づくように親和性の効果が多価ファージに対して低減され、ファージミドベクターが使用され、これがDNA操作を単純にするLowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991)。ファージディスプレイ法は、抗体様分子を生成するため技術を含む(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p627-628; Lee et al.).4050

【0067】

「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えばC o 1 E 1、及びバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、糸状バクテリオファージ及びラムダ状バクテリオファージを含む任意の既知のバクテリオファージで使用されうる。プラスミドはまた一般には抗生物質耐性の選択マーカーも含む。これらのベクターにクローニングされるDNAのセグメントはプラスミドとして増殖することができる。これらのベクターを内部に持つ細胞がファージ粒子の生産のために必要な全ての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミドDNAの1つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファージミドは感染性または非感染性ファージ粒子を形成しうる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子表面に提示されるように遺伝子融合体としてこの異種ポリペプチドの遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子又はその断片を含むファージミドを含む。

【0068】

「リンカー」、「リンカーユニット」又は「連結」は、共有結合を含む化学的成分又は共有結合にて抗体を薬剤成分に結合させる原子の鎖を意味する。様々な実施態様では、リンカーはLと表される。リンカーには、二価のラジカル、例としてalkyldiyl、aryldiyl、heteroaryldiyl、アルキロキシ(例としてpolyethylenoxy、PEG、polymethyleneoxy)及びアルキラミノ(例えはpolyethyleneamino、JeffamineTM)の繰り返しユニットである-(CR₂)_nO(CR₂)_n-などの成分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロン酸及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

【0069】

「標識」なる用語は、抗体に共有結合的に接着することができ、(i) 検出可能なシグナルを生じ；(ii) 第二標識と相互作用して、第一又は第二標識、例えはFRET(蛍光共鳴エネルギー転移)によって生じる検出可能なシグナルを修飾し；(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定させるかまたは結合の親和性を増やし；(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的パラメータによって、移動度、例えは電気泳動移動度又は細胞透過性に作用し、又は(v) キャプチャ分子を生じさせ、リガンド親和性、抗体 / 抗原結合又はイオン複合体調節するために機能する、任意の成分を意味する。

【0070】

本明細書中で用いる立体化学的定義及び慣例は、一般にS. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及びEliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在し、すなわち直線偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物を記載する場合、接頭語DとL又はRとSを用いて、キラル中心(一又は複数)の周りの分子の絶対配置を示す。接頭後dとL又はRとSは(+)(+)と(-)(-)は、化合物による直線偏光の回転のサインを示すために用いるものであって、(-)(-)又は1は化合物が左旋性であることを意味する。(+)又はdを接頭に付した化合物は右旋性である。所定の化学構造では、互いの鏡像であることを除いて、これらの立体異性体は同一である。また、特定の立体異性体は鏡像異性体とも称され、この異性体の混合物は鏡像異性体混合物と称されることが多い。鏡像異性体の50:50混合物は、化学的反応又は過程において立体選別でも立体特異性でもなくなった場合に生じうるラセミ混合物又はラセミ化合物を指す。「ラセミ混合物」及び「ラセミ化合物」なる用語は、光学的活性を欠く、2つの鏡像異性種を指す。

【0071】

「薬学的に許容される塩」なる用語は、薬学的に許容可能なAZCの有機塩又は無機塩を言う。例示的な塩には、限定するものではないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ素、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酒石酸水素塩、アスコルビン酸塩、琥珀酸塩、マレイン酸塩、gentisinate、フマル酸塩、グルコン酸塩、グロクロン酸塩、糖酸塩、蟻酸塩、安息香酸塩

10

20

30

40

50

、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、及びパモ酸塩(すなわち、1,1'-メチレンビス(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート))が含まれる。薬学的に許容可能な塩は、他の分子、例えば酢酸イオン、琥珀酸イオン又は他の対イオンの包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物上の荷電を安定化する任意の有機又は無機の成分でもよい。さらに、薬学的に許容可能な塩は、その構造内に複数の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容可能な塩の一部である場合は複数の対イオンを有しうる。したがって、薬学的に許容可能な塩は、一又は複数の荷電原子及び/又は一又は複数の対イオンを有してもよい。

【0072】

「薬学的に許容される溶媒和物」とは、1つまたは複数の溶媒分子及びA Z Cとの会合を指す。薬学的に許容される溶媒和物を形成する溶媒の例としては、限定されないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、D M S O、酢酸エチル、酢酸、エタノールが含まれる。

【0073】

次の略語が本明細書中で使用され、指定された定義を持つ：B M Eは、-メルカプトエタノールであり。B o cはN-(t-ブトキシカルボニル)(N-(t-butoxycarbonyl))であり、c i tはシトルリン(2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸)(citrulline (2-amin o-5-ureido pentanoic acid))であり、d a pはドラプロリン(dolaproline)であり、D C Cは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1,3-dicyclohexylcarbodiimide)であり、D C Mは、ジクロロメタン(dichloromethane)であり、D E Aは、ジエチルアミン(diethylamine)であり、DEADは、アゾジカルボン酸ジエチル(diethylazodicarboxylate)であり、D E P Cは、シアノホスホン酸ジエチル(diethylphosphorylcyanide)であり、D I A Dは、アゾジカルボン酸ジイソプロピル(diisopropylazodicarboxylate)であり、D I E AはN,N-エチルアミンジイソプロピル(N,N-diisopropylethylamine)であり、d i lはドライソロイシン(dolaisoleucine)であり、D M Aはジメチルアセトアミド(dimethylacetamide)であり、D M A Pは4-ジメチルアミノピリジン(4-dimethylaminopyridine)であり、D M Eは、エチレングリコールジメチルエーテル(ethylene glycol dimethyl ether)（又は1,2-ジメトキシエタン(1,2-dimethoxyethane)）であり、D M FはN,N-ジメチルホルムアミド(N,N-dimethylformamide)であり、D M S Oは、ジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide)であり、d o eはドラフェニン(dolaphenine)であり、d o vは、N,N-ジメチルバリン(N,N-dimethylvaline)であり、DTNBは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))であり、D T P Aは、ジエチレントリアミン5酢酸(diethylenetriaminepentaacetic acid)であり、D T Tは、ジチオスレイトール(dithiothreitol)であり、E D C Iは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(1-(3-dimethylamino propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride)であり、E E D Qは、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン(2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline)であり、E S - M Sは、エレクトロスプレー質量分析であり、E t O A cは、酢酸エチルであり、F m o cは、N-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)(N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl))であり、g l yはグリシンであり、H A T Uは、O-(7-アザベンゾトリアゾル-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロスフェート(O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate)であり、H O B tは、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(1-hydroxybenzotriazole)であり、H P L Cは、高速液体クロマトグラフィーであり、i l eは、イソロイシンであり、l y sはリジンであり、M e C N (C H ₃ C N)はアセトニトリル(acetonitrile)であり、M e O Hは、メタノールであり、M t rは、4-アニシリジフェニルメチル(又は4-メトキシトリチル)(4-anisyl diphenylmethyl (or 4-methoxytrityl))、もしくは、(1S, 2R)-(+)-ノルエフェドリン((1S, 2R)-(+)-norephedrine)であり、P B Aは、p-アミノベンジルカルバモイル(p-aminobenzyl carbamoyl)であり、P B Sは、リン酸緩衝塩類溶液(phosphate-buffered saline)(pH 7)であり、P E Gは

10

20

30

40

50

、ポリエチレングリコールであり、P hは、フェニルであり、Pnpはp-ニトロフェニル(p-nitrophenyl)であり、M Cは、6-マレイミドカプロイル(6-maleimidocaproyl)であり、p h eは、L-フェニルアラニンであり、P y B r o pは、プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(bromo tris-pyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate)であり、S E Cは、サイズ排除クロマトグラフィーであり、S uは、スクシンイミドであり、T F Aは、トリフルオロ酢酸であり、T L Cは薄層クロマトグラフィーであり、U Vは、紫外線であり、及びv a lはバリンである。

【0074】

システイン改変抗体

本発明の化合物は、野生型又は親抗体の一つまたは複数のアミノ酸がシステインアミノ酸で置換されているシステイン改変抗体を含む。抗体の何れの型でも改変、すなわち変異導入され得る。例えば、親のF a b抗体断片は、システイン改変F a bを形成するために改変され得、ここでは「T h i o F a b」として参照される。同様に、親のモノクローナル抗体は「T h i o M a b」を形成するために改変され得る。単一部位の変異はT h i o F a bの单一の改変システイン残基を生成し、一方、I g G抗体の二量体の性質のために単一部位の変異はT h i o M a bの2つの改変されたシステイン残基を生成するすることに留意すべきである。置換された(改変された)システイン(C y s)残基を持つ変異体は、新たに導入され、改変されたシステインのチオール基の反応性について評価される。チオールの反応性値は0から1.0の範囲の相対的な数値であり、任意のシステイン改変抗体について測定できる。本発明のシステイン改変抗体のチオールの反応性値は、0.6から1.0; 0.7から1.0; 又は0.8から1.0である。本発明の設計、選択、及び調製方法は求電子的機能性により反応的であるシステイン改変抗体を可能とする。これらの方法はさらに、指定され、設計された、選択的な部位でジルコニウム原子を有する抗体ジルコニウムコンジュゲート(A Z C)などの抗体複合体化合物を可能とする。抗体表面の反応性のシステイン残基は、マレイミド基又はハロアセチル基などのチオール反応性基を介してジルコニウム基を特異的に結合させることを可能とする。C y s残基のチオール機能のマレイミド基に対する求核反応性は、タンパク質内の他のアミノ酸の機能性、例えばリジン残基のアミノ基又はN末端アミノ基などに比べ約1000倍高い。ヨードアセチル試薬及びマレイミド試薬のチオール固有の機能性によりアミン基と反応し得るが、より高いp H(>9.0)及びより長い反応時間を要する(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【0075】

本発明のシステイン改変抗体は、好ましくは、野生型、親抗体のカウンターパートの抗原結合能力を保持する。従って、システイン改変抗体は、好ましくは特異的には、抗原に結合することが可能である。そのような抗原としては、例えば、腫瘍関連抗原(T A A)、細胞表面レセプタータンパク質及び他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化、リンホカイン、サイトカインに関連付けられている分子(例えば、既知であるか又は機能性に寄与すると疑われるもの)、細胞周期の調節に関与する分子、脈管形成に関与する分子、及び血管新生に関連付けられている分子(例えば、既知であるか又は機能性に寄与すると疑われるもの)を含む。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子(すなわちC D タンパク質)である可能性がある。システイン改変抗体が結合することができる抗原は、上記のカテゴリのいずれかのサブセットのメンバーであり得、前記カテゴリの他のサブセットは(対象の抗原に関して)異なる特性を持つ他の分子/抗原を含む。

【0076】

親抗体は、米国特許第5 8 2 1 3 3 7号の表3に記載されるh u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7及びh u M A b 4 D 5 - 8(トラスツズマブ、ハーセプチニ(H E R C E P T I N)(登録商標))から選択されるヒト化抗体であってもよく、本明細書に記述されるヒト化5 2 0 C 9抗体(国際公開第9 3 / 2 1 3 1 9

10

20

30

40

50

号) 及びヒト化 2 C 4 抗体を参照により本明細書に明確に援用される。

【 0 0 7 7 】

本発明のシステイン改変抗体は、部位特異的かつ効率的にチオール反応性試薬と結合させることができる。チオール反応性試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えば、ビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば、フルオロフォア試薬)、固相固定化試薬(例えばSEPHAROSETM、ポリスチレン、又はガラス)、又はジルコニウムリンカー中間体であり得る。チオール反応性試薬の一例はN-エチルマレイミド(NEM)である。典型的な実施態様において、Thiophabのビオチンリンカー試薬との反応は、ビオチン標識化Thiophabを与え、それによって改変されたシステイン残基が検出され測定され得る。Thiophabの多機能性リンカー試薬との反応は多機能性リンカー付きのThiophabを与え、それにより更にジルコニウム成分又は別の標識と反応され得る。Thiophabのジルコニウムリンカー中間体との反応はThiophabジルコニウムコンジュゲートを与える。

【 0 0 7 8 】

ここで記載される典型的な方法は一般に抗体の同定及び產生に適用され得、より一般的には本明細書に記載された設計及びスクリーニング工程の適用を通じて別のタンパク質に適用され得る。

【 0 0 7 9 】

このようなアプローチは、反応基が、例えば、マレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性結合パートナーである、他のチオール反応性剤の結合に適用され得る(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。パートナーは、細胞毒性剤(例えば、ドキソルビシン又は百日咳毒素など)、フルオレセイン様又はローダミン様蛍光色素などのフルオロフォア、イメージング又は放射線治療の金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識又は検出タグ、又はポリエチレングリコールの様々なアイソフォームなどのクリアランス修飾剤、第3の成分に結合するペプチド、又はその他の炭水化物又は親油性剤であり得る。

【 0 0 8 0 】

典型的な抗体断片であるhu4D5Fabv8で同定された部位は、ここでは主に抗体の定常ドメインにあり、抗体の全ての種にわたって保存されている。これらの部位は、さらに特定の抗体の構造の構造設計及び知識を必要とせずに、かつ抗体の可変ドメインに固有の抗原結合特性の干渉することなく、他の抗体に広く適用可能であるべきである。

【 0 0 8 1 】

癌の治療に有用なシステイン改変抗体は、限定されないが、細胞表面レセプター及び腫瘍関連抗原(TAA)に対する抗体を含む。そのような抗体は、(標識成分に結合していない)ネイキッド抗体、又は式Iの抗体-ジルコニウムコンジュゲート(AZC)として使用することができる。腫瘍関連抗原は、当技術分野で知られており、当該技術分野で周知の方法及び情報を使用して、抗体を生成する際に使用するために調製することができる。癌の診断及び治療のための効果的な細胞標的を発見する試みにおいて、研究者は、膜貫通ポリペプチド、又はそうでなければ一つ以上正常な非癌細胞上に比べて癌細胞の一つ以上特定の型の表面上に特異的に発現された腫瘍関連ポリペプチドを同定しようとしてきた。多くの場合、腫瘍関連ペプチドは、非癌細胞の表面上に比べてより豊富に癌細胞の表面上に発現している。そのような腫瘍関連細胞表面の抗原ペプチドの同定は、抗体ベースの治療を経由して癌細胞を破壊するために標的とする能力を生じさせてきた。

【 0 0 8 2 】

TAAの例は、限定されないが、下にリストされたTAA(1)-(36)を含む。便宜上、これらの抗原に関連する情報で当該技術分野で知られているすべては以下のリスト

され、国立バイオテクノロジー情報センター（N C B I）の核酸及びタンパク質の配列同定規則に従い、名前、代替名、G e n b a n k 受託番号及び主要参照文献を含む。T A A (1) - (36) に対応する核酸とタンパク質配列は、G e n B a n k などの公共のデータベースで利用可能である。抗体により標的とされる腫瘍関連抗原は引用文献で同定された配列に対して少なくとも約70%、80%、85%、90%、又は95%の配列同一性を含むか、又は引用文献に記載の配列を有するT A Aとして、実質的に同一な生物学的特性ないしは特徴を示す全てのアミノ酸配列変異体及びアイソフォームを含む。たとえば、変異体配列を有するT A Aは、一般に、記載された対応する配列を持つT A Aに特異的に結合する抗体に特異的に結合することができる。

本明細書に具体的に引用される文献中の配列及び開示は参考により明示的に援用される
10
。

【0083】

腫瘍関連抗原(1) - (36) :

(1) B M P R 1 B (骨形成タンパク質レセプタータイプI B型, G e n b a n k 受託番号N M _ 0 0 1 2 0 3)

ten Dijke, P., et al Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997); 国際公開第2004063362号(請求項2); 国際公開第2003042661号(請求項12); 米国特許出願公開第2003134790-A1号(頁38-39); 国際公開第2002102235号(請求項13; 頁296); 国際公開第2003055443号(頁91-92); 国際公開第200299122号(実施例2; 頁528-530); 国際公開第2003029421号(請求項6); 国際公開第2003024392号(請求項2; 図112); 国際公開第200298358号(請求項1; 頁183); 国際公開第200254940号(頁100-101); 国際公開第200259377号(頁349-350); 国際公開第200230268号(請求項27; 頁376); 国際公開第200148204号(実施例; 図4)

N P _ 0 0 1 1 9 4 骨形成タンパク質レセプター, タイプI B / p i d = N P _ 0 0 1 1 9 4 . 1 -

相互参照: M I M : 6 0 3 2 4 8 ; N P _ 0 0 1 1 9 4 . 1 ; A Y 0 6 5 9 9 4

【0084】

(2) E 1 6 (L A T 1, S L C 7 A 5, G e n b a n k 受託番号N M _ 0 0 3 4 8 6)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273; 国際公開第2004048938号(実施例2); 国際公開第2004032842号(実施例IV); 国際公開第2003042661号(請求項12); 国際公開第2003016475号(請求項1); 国際公開第200278524号(実施例2); 国際公開第200299074号(請求項19; 頁127-129); 国際公開第200286443号(請求項27; 頁222, 393); 国際公開第2003003906号(請求項10; 頁293); 国際公開第200264798号(請求項33; 頁93-95); 国際公開第200014228号(請求項5; 頁133-136); 米国特許出願公開第2003224454号(図3); 国際公開第2003025138号(請求項12; 頁150);

N P _ 0 0 3 4 7 7 溶質担体ファミリー7(カチオン性アミノ酸輸送体, y + システム), メンバー5 / p i d = N P _ 0 0 3 4 7 7 . 3 - ホモサピエンス

相互参照: M I M : 6 0 0 1 8 2 ; N P _ 0 0 3 4 7 7 . 3 ; N M _ 0 1 5 9 2 3 ; N M _ 0 0 3 4 8 6 _ 1

【0085】

(3) S T E A P 1 (前立腺の6回膜貫通型上皮抗原, G e n b a n k 受託番号N M _ 0 1 2 4 4 9)

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Ac 50

ad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528); 国際公開第2004065577号(請求項6); 国際公開第2004027049号(図1L); 欧州特許第1394274号(実施例11); 国際公開第2004016225号(請求項2); 国際公開第2003042661号(請求項12); 米国特許出願公開第2003157089号(実施例5); 米国特許出願公開第2003185830号(実施例5); 米国特許出願公開第2003064397号(図2); 国際公開第200289747号(実施例5; 頁618-619); 国際公開第2003022995号(実施例9; 図13A, 実施例53; 頁173, 実施例2; 図2A);

NP_036581前立腺の6回膜貫通型上皮抗原

相互参照: MIM: 604415; NP_036581.1; NM_012449_1 10

【0086】

(4)0772P (CA125, MUC16, Genbank受託番号AF361486)

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001); 国際公開第2004045553号(請求項14); 国際公開第200292836号(請求項6; 図12); 国際公開第200283866号(請求項15; 頁116-121); 米国特許出願公開第2003124140号(実施例16); 相互参照: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486_1

【0087】

(5)MPF (MPF, MSLN, SMR, 巨核球増強因子、メソテリン, Genbank受託番号NM_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995); 国際公開第2003101283号(請求項14); (国際公開第2002102235号(請求項13; 頁287-288); 国際公開第2002101075号(請求項4; 頁308-309); 国際公開第200271928号(頁320-321); 国際公開第9410312号(頁52-57); 相互参照: MIM: 601051; NP_005814.2; NM_005823_1 20

【0088】

(6)Napi3b (NAPI-3B, NPTI1b, SLC34A2, 溶質輸送体ファミリー34(リン酸ナトリウム), メンバー2, II型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター3b, Genbank受託番号NM_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; 国際公開第2004022778号(請求項2); 欧州特許第1394274号(実施例11); 国際公開第2002102235号(請求項13; 頁326); 欧州特許第8755569号(請求項1; 頁17-19); 国際公開第200157188号(請求項20; 頁329); 国際公開第2004032842号(実施例IV); 国際公開第200175177号(請求項24; 頁139-140);

相互参照: MIM: 604217; NP_006415.1; NM_006424_1 40

【0089】

(7)Sema5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, セマフォリン5b Holog, セマドメイン(semadomain), 7回トロンボスボンジン反復(1型及び1型様), 膜貫通ドメイン(TM)および短い細胞質ドメイン(セマフォリン)5B, Genbank受託番号AB040878) Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; 国際公開第2004000997号(請求項1); 国際公開第2003003984号(請求項1); 国際公開第200206339号(請求項1; 頁50); 国際公開第200188133号(請求項1; 頁41-43, 48-58); 国際公開第2003054152号(請求項20); 国際公開第2003101400号(請求項11); 受託番号: Q9P283; EMBL; A 50

B 0 4 0 8 7 8 ; B A A 9 5 9 6 9 . 1 . G e n e w ; H G N C : 1 0 7 3 7 ;

【 0 0 9 0 】

(8) P S C A h 1 g (2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 R i k , C 5 3 0 0 0 8 0 1 6 R i k , R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 , R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 遺伝子 , G e n b a n k 受託番号 A Y 3 5 8 6 2 8) ; Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 2 9 1 9 2 号 (請求項 2) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 4 4 1 8 0 号 (請求項 12) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 4 4 1 7 9 号 (請求項 11) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 9 6 9 6 1 号 (請求項 11) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 2 3 2 0 5 6 号 (実施例 5) ; 國際公開第 2 0 0 3 1 0 5 7 5 8 号 (請求項 12) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 2 0 6 9 1 8 号 (実施例 5) ; 欧州特許第 1 3 4 7 0 4 6 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 2 5 1 4 8 号 (請求項 2 0) ;

相互参照 : G I : 3 7 1 8 2 3 7 8 ; A A Q 8 8 9 9 1 . 1 ; A Y 3 5 8 6 2 8 _ 1

【 0 0 9 1 】

(9) E T B R (エンドセリンタイプ B レセプター , G e n b a n k 受託番号 A Y 2 7 5 4 6 3) ;

Nakamura M. , et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y. , et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H. , et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H. , et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A. , Yanagisawa M. , et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991 ; Elshourbagy N.A. , et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B. , et al J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M. , et al Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L. , et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C. , et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y. , et al Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B. , et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W. , et al Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G. , et al Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T. , et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A. , et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J. , et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W. , et al Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J. , et al Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S. , et al Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V. , et al (2002) Hum. Genet. 111, 198-206 ; 國際公開第 2 0 0 4 0 4 5 5 1 6 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 4 0 4 8 9 3 8 号 (実施例 2) ; 國際公開第 2 0 0 4 0 4 0 0 0 0 号 (請求項 15 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 8 7 7 6 8 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 2 6 1 0 8 7 号 (図 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 1 6 4 9 4 号 (図 6) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 2 5 1 3 8 号 (請求項 12 ; 頁 1 4 4) ; 國際公開第 2 0 0 1 9 8 3 5 1 号 (請求項 1 ; 頁 1 2 4 - 1 2 5) ; 欧州特許第 5 2 2 8 6 8 号 (請求項 8 ; 図 2) ; 國際公開第 2 0 0 1 7 7 1 7 2 号 (請求項 1 ; 頁 2 9 7 - 2 9 9) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 0 9 6 7 6 号 ; 米国特許第 6 5 1 8 4 0 4 号 (図 3) ; 米国特許第 5 7 7 3 2 2 3 号 (請求項 1 a ; C o l 3 1 - 3 4) ; 國際公開第 2 0 0 4 0 0 1 0 0 4 号 ;

【 0 0 9 2 】

(1 0) M S G 7 8 3 (R N F 1 2 4 , 推定タンパク質 F L J 2 0 3 1 5 , G e n b a n k 受託番号 N M _ 0 1 7 7 6 3) ;

國際公開第 2 0 0 3 1 0 4 2 7 5 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 4 0 4 6 3 4 2 号 (実施例 2) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 4 2 6 6 1 号 (請求項 12) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 8 3 0 7 4 号 (請求項 14 ; 頁 6 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 1 8 6 2 1 号 (請求項 1) ; 國際公開第 2 0 0 3 0 2 4 3 9 2 号 (請求項 2 ; 図 9 3) ; 國際公開第 2 0 0 1 6 6 6 8 9 号 (実施例 6) ;

相互参照 : 遺伝子座番号 : 5 4 8 9 4 ; N P _ 0 6 0 2 3 3 . 2 ; N M _ 0 1 7 7 6 3 _ 50

1

【0093】

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STA
MP1, STEAP2, STMP, 前立腺癌関連遺伝子1, 前立腺癌関連タンパク質1,
前立腺の6回膜貫通型上皮抗原2, 6回膜貫通型前立腺タンパク質, Genbank受託
番号AF455138)

Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); 国際公開第2003087306号; 米国特
許出願公開第2003064397号(請求項1; 図1); 国際公開第20027259
6号(請求項13; 頁54-55); 国際公開第200172962号(請求項1; 図4
B); 国際公開第2003104270号(請求項11); 国際公開第20031042
70号(請求項16); 米国特許出願公開第2004005598号(請求項22); 国
際公開第2003042661号(請求項12); 米国特許出願公開第20030606
12号(請求項12; 図10); 国際公開第200226822号(請求項23; 図2)
; 国際公開第200216429号(請求項12; 図10);
相互参照: GI: 22655488; AAN04080.1; AF455138_1

【0094】

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B
, 一過性レセプター電位カチオンチャネル, サブファミリーM, メンバー4, Genba
nk受託番号NM_017636)

Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 1
09 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003); 米国特許出願
公開第2003143557号(請求項4); 国際公開第200040614号(請求項
14; 頁100-103); 国際公開第200210382号(請求項1; 図9A); 国
際公開第2003042661号(請求項12); 国際公開第200230268号(請
求項27; 頁391); 米国特許出願公開第2003219806号(請求項4); 国際
公開第200162794号(請求項14; 図1A-D);

相互参照: MIM: 606936; NP_060106.2; NM_017636_1

【0095】

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 奇形癌
腫由来増殖因子, Genbank受託番号NP_003203又はNM_003212)
Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3)
:555-565 (1991); 米国特許出願公開第2003224411号(請求項1); 国際公開
第2003083041号(実施例1); 国際公開第2003034984号(請求項1
2); 国際公開第200288170号(請求項2; 頁52-53); 国際公開第200
3024392号(請求項2; 図58); 国際公開第200216413号(請求項1;
頁94-95, 105); 国際公開第200222808号(請求項2; 図1); 米国特
許第5854399号(実施例2; Col 17-18); 米国特許第5792616号
(図2);

相互参照: MIM: 187395; NP_003203.1; NM_003212_1

【0096】

(14) CD21 (CR2(補体レセプター2)又はC3DR (C3d / エブスタイン
バーウイルスレセプター)又はHs.73792 Genbank受託番号M26004)
Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al J. Exp.
Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9
194-9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et
al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993)
J. Immunol. 150, 5311-5320; 国際公開第2004045520号(実施例4); 米国特
許出願公開第2004005538号(実施例1); 国際公開第2003062401号
(請求項9); 国際公開第2004045520号(実施例4); 国際公開第91025
36号(図9.1-9.9); 国際公開第2004020595号(請求項1);

10

20

30

40

50

受託番号 : P 2 0 0 2 3 ; Q 1 3 8 6 6 ; Q 1 4 2 1 2 ; E M B L ; M 2 6 0 0 4 ; A A
A 3 5 7 8 6 . 1 .

【 0 0 9 7 】

(1 5) C D 7 9 b (C D 7 9 B , C D 7 9 , I G b (免疫グロブリン関連 (immunoglobulin-associated beta)) , B 2 9 , G e n b a n k 受託番号 N M _ 0 0 0 6 2 6 又は 1 1 0 3 8 6 7 4)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):306 8-3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625; 国際公開第 2 0 0 4 0 1 6 2 2 5 号 (請求項 2 , 図 1 4 0) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 7 7 6 8 号 , 米国特許出願公開第 2 0 0 4 1 0 1 8 7 4 号 (請求項 1 , 頁 1 0 2) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 6 2 4 0 1 号 (請求項 9) ; 国際公開第 2 0 0 2 7 8 5 2 4 号 (実施例 2) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 2 1 5 0 5 7 3 号 (請求項 5 , 頁 1 5) ; 米国特許第 5 6 4 4 0 3 3 号 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 4 8 2 0 2 号 (請求項 1 , 頁 3 0 6 及び 3 0 9) ; 国際公開第 9 9 / 5 5 8 6 5 8 号 , 米国特許第 6 5 3 4 4 8 2 号 (請求項 1 3 , 図 1 7 A / B) ; 国際公開第 2 0 0 0 5 5 3 5 1 号 (請求項 1 1 , 頁 1 1 4 5 - 1 1 4 6) ;

相互参照 : M I M : 1 4 7 2 4 5 ; N P _ 0 0 0 6 1 7 . 1 ; N M _ 0 0 0 6 2 6 _ 1

【 0 0 9 8 】

(1 6) F c R H 2 (I F G P 4 , I R T A 4 , S P A P 1 A (S H 2 ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質 1 a) , S P A P 1 B , S P A P 1 C , G e n b a n k 受託番号 N M _ 0 3 0 7 6 4 , A Y 3 5 8 1 3 0)

Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; 国際公開第 2 0 0 4 0 1 6 2 2 5 号 (請求項 2) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 7 7 8 3 6 ; 国際公開第 2 0 0 1 3 8 4 9 0 号 (請求項 5 ; 図 1 8 D - 1 - 1 8 D - 2) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 9 7 8 0 3 号 (請求項 1 2) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 9 6 2 4 号 (請求項 2 5) ;

相互参照 : M I M : 6 0 6 5 0 9 ; N P _ 1 1 0 3 9 1 . 2 ; N M _ 0 3 0 7 6 4 _ 1

【 0 0 9 9 】

(1 7) H E R 2 (E r b B 2 , G e n b a n k 受託番号 M 1 1 7 3 0)

Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426-429; 国際公開第 2 0 0 4 0 4 8 9 3 8 号 (実施例 2) ; 国際公開第 2 0 0 4 0 2 7 0 4 9 号 (図 1 I) ; 国際公開第 2 0 0 4 0 0 9 6 2 2 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 1 2 1 0 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 9 9 0 4 号 (請求項 9) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 1 6 4 7 5 号 (請求項 1) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 1 8 5 9 2 号 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 0 8 5 3 7 号 (請求項 1) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 5 5 4 3 9 号 (請求項 2 9 ; 図 1 A - B) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 2 5 2 2 8 号 (請求項 3 7 ; 図 5 C) ; 国際公開第 2 0 0 2 2 2 6 3 6 号 (実施例 1 3 ; 頁 9 5 - 1 0 7) ; 国際公開第 2 0 0 2 1 2 3 4 1 号 (請求項 6 8 ; 図 7) ; 国際公開第 2 0 0 2 1 3 8 4 7 号 (頁 7 1 - 7 4) ; 国際公開第 2 0 0 2 1 4 5 0 3 号 (頁 1 1 4 - 1 1 7) ; 国際公開第 2 0 0 1 5 3 4 6 3 号 (請求項 2 ; 頁 4 1 - 4 6) ; 国際公開第 2 0 0 1 4 1 7 8 7 号 (頁 1 5) ; 国際公開第 2 0 0 0 4 4 8 9 9 号 (請求項 5 2 ; 図 7) ; 国際公開第 2 0 0 0 2 0 5 7 9 号 (請求項 3 ; 図 2) ; 米国特許第 5 8 6 9 4 4 5 号 (請求項 3 ; C o l 3 1 - 3 8) ; 国際公開第 9 6 3 0 5 1 4 号 (請求項 2 ; 頁 5 6 - 6 1) ; 欧州特許第 1 4 3 9 3 9 3 号 (請求項 7) ; 国際公開第 2 0 0 4 0 4 3 3 6 1 号 (請求項 7) ; 国際公開第 2 0 0 4 0 2 2 7 0 9 号 ; 国際公開第 2 0 0 1 0 0 2 4 4 号 (実施例 3 ; 図 4) ; 受託番号 : P 0 4 6 2 6 ; E M B L ; M 1 1 7 6 7 ; A A A 3 5 8 0 8 . 1 . E M B L ; M 1 1 7 6 1 ; A A A 3 5 8 0 8 . 1 .

10

20

30

40

50

【0100】

(18) NCA (CEACAM6, Genbank受託番号M18728) ;
 Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; 国際公開第2004063709; 欧州特許第1439393号(請求項7); 国際公開第2004044178号(実施例4); 国際公開第2004031238号; 国際公開第2003042661号(請求項12); 国際公開第200278524号(実施例2); 国際公開第200286443号(請求項27; 頁427); 国際公開第200260317号(請求項2);
 受託番号: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915. 10
 1. EMBL; M18728;

【0101】

(19) MDP (DPEP1, Genbank受託番号BC017023)
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002); 国際公開第2003016475号(請求項1); 国際公開第200264798号(請求項33; 頁85-87); 特公平5-003790号公報(図6-8); 国際公開第9946284号(図9);

相互参照: MIM: 179780; AAH17023.1; BC017023_1

【0102】

(20) IL20R (IL20Ra, ZCYTOR7, Genbank受託番号AF184971);
 Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; 欧州特許第1394274号(実施例11); 米国特許出願公開第2004005320号(実施例5); 国際公開第2003029262号(頁74-75); 国際公開第2003002717号(請求項2; 頁63); 国際公開第200222153号(頁45-47); 米国特許出願公開第2002042366号(頁20-21); 国際公開第200146261号(頁57-59); 国際公開第200146232号(頁63-65); 国際公開第9837193号(請求項1; 頁55-59);

受託番号: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

【0103】

(21) ブレビカン (BCAN, BEHAB, Genbank受託番号AF229053);
 Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; 米国特許出願公開第2003186372号(請求項11); 米国特許出願公開第2003186373号(請求項11); 米国特許出願公開第2003119131号(請求項1; 図52); 米国特許出願公開第2003119122号(請求項1; 図52); 米国特許出願公開第2003119126号(請求項1); 米国特許出願公開第2003119121号(請求項1; 図52); 米国特許出願公開第2003119129号(請求項1); 米国特許出願公開第2003119130号(請求項1); 米国特許出願公開第2003119128号(請求項1; 図52); 米国特許出願公開第2003119125号(請求項1); 国際公開第2003016475号(請求項1); 国際公開第200202634号(請求項1);

【0104】

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Gen 50

b a n k 受託番号 N M _ 0 0 4 4 4 2)

Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000))；国際公開第 2 0 0 3 0 4 2 6 6 1 号(請求項 12)；国際公開第 2 0 0 0 5 3 2 1 6 号(請求項 1；頁 4 1)；国際公開第 2 0 0 4 0 6 5 5 7 6 号(請求項 1)；国際公開第 2 0 0 4 0 2 0 5 8 3 号(請求項 9)；国際公開第 2 0 0 3 0 0 4 5 2 9 号(頁 1 2 8 - 1 3 2)；国際公開第 2 0 0 0 5 3 2 1 6 号(請求項 1；頁 4 2)；

相互参照：M I M : 6 0 0 9 9 7 ；N P _ 0 0 4 4 3 3 . 2 ；N M _ 0 0 4 4 4 2 _ 1
【0 1 0 5】

(23) A S L G 6 5 9 (B 7 h, G e n b a n k 受託番号 A X 0 9 2 3 2 8)

10

米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 1 0 1 8 9 9 号(請求項 2)；国際公開第 2 0 0 3 1 0 4 3 9 9 号(請求項 11)；国際公開第 2 0 0 4 0 0 0 2 2 1 号(図 3)；米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 6 5 5 0 4 号(請求項 1)；米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 2 4 1 4 0 号(実施例 2)；米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 6 5 1 4 3 号(図 6 0)；国際公開第 2 0 0 2 1 0 2 2 3 5 号(請求項 13；頁 2 9 9)；米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 9 1 5 8 0 号(実施例 2)；国際公開第 2 0 0 2 1 0 1 8 7 号(請求項 6；図 1 0)；国際公開第 2 0 0 1 9 4 6 4 1 号(請求項 12；図 7 b)；国際公開第 2 0 0 2 0 2 6 2 4 号(請求項 1 3；図 1 A - 1 B)；米国特許出願公開第 2 0 0 2 0 3 4 7 4 9 号(請求項 5 4；頁 4 5 - 4 6)；国際公開第 2 0 0 2 0 6 3 1 7 号(実施例 2；頁 3 2 0 - 3 2 1, 請求項 3 4；頁 3 2 1 - 3 2 2)；国際公開第 2 0 0 2 7 1 9 2 8 号(頁 4 6 8 - 4 6 9)；国際公開第 2 0 0 2 0 2 5 8 7 号(実施例 1；図 1)；国際公開第 2 0 0 1 4 0 2 6 9 号(実施例 3；頁 1 9 0 - 1 9 2)；国際公開第 2 0 0 0 3 6 1 0 7 号(実施例 2；頁 2 0 5 - 2 0 7)；国際公開第 2 0 0 4 0 5 3 0 7 9 号(請求項 1 2)；国際公開第 2 0 0 3 0 0 4 9 8 9 号(請求項 1)；国際公開第 2 0 0 2 7 1 9 2 8 号(頁 2 3 3 - 2 3 4, 4 5 2 - 4 5 3)；国際公開第 0 1 1 6 3 1 8 号；

【0 1 0 6】

(24) P S C A (前立腺幹細胞抗原前駆体, G e n b a n k 受託番号 A J 2 9 7 4 3 6)

Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):78 3-788；国際公開第 2 0 0 4 0 2 2 7 0 9 号；欧州特許第 1 3 9 4 2 7 4 号(実施例 1 1)；米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 1 8 5 5 3 号(請求項 1 7)；国際公開第 2 0 0 3 0 0 8 5 3 7 号(請求項 1)；国際公開第 2 0 0 2 8 1 6 4 6 号(請求項 1；頁 1 6 4)；国際公開第 2 0 0 3 0 0 3 9 0 6 号(請求項 1 0；頁 2 8 8)；国際公開第 2 0 0 1 4 0 3 0 9 号(実施例 1；図 1 7)；米国特許出願公開第 2 0 0 1 0 5 5 7 5 1 号(実施例 1；図 1 b)；国際公開第 2 0 0 0 3 2 7 5 2 号(請求項 1 8；図 1)；国際公開第 9 8 5 1 8 0 5 号(請求項 1 7；頁 9 7)；国際公開第 9 8 5 1 8 2 4 号(請求項 1 0；頁 9 4)；国際公開第 9 8 4 0 4 0 3 号(請求項 2；図 1 B)；

受託番号：0 4 3 6 5 3 ；E M B L ；A F 0 4 3 4 9 8 ；A A C 3 9 6 0 7 . 1 .

【0 1 0 7】

(25) G E D A (G e n b a n k 受託番号 A Y 2 6 0 7 6 3)；
A A P 1 4 9 5 4 脂肪腫 H M G I C 融合パートナー様タンパク質(fusion-partner-like protein) / p i d = A A P 1 4 9 5 4 . 1 - ホモ・サピエンス種：ホモサピエンス(ヒト)

国際公開第 2 0 0 3 0 5 4 1 5 2 号(請求項 2 0)；国際公開第 2 0 0 3 0 0 0 8 4 2 号(請求項 1)；国際公開第 2 0 0 3 0 2 3 0 1 3 号(実施例 3, 請求項 2 0)；米国特許出願公開第 2 0 0 3 1 9 4 7 0 4 号(請求項 4 5)；

相互参照：G I : 3 0 1 0 2 4 4 9 ；A A P 1 4 9 5 4 . 1 ；A Y 2 6 0 7 6 3 _ 1

【0 1 0 8】

(26) B A F F - R (B 細胞活性化因子レセプター, B L y S レセプター 3, B R 3

50

, Genbank 受託番号 AF 116456) ; BAFF レセプター / pid = NP_443177.1 - ホモサピエンス Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); 国際公開第 2004058309 号; 国際公開第 2004011611; 国際公開第 2003045422 号 (実施例; 頁 32 - 33); 国際公開第 2003014294 号 (請求項 35; 図 6B); 国際公開第 2003035846 号 (請求項 70; 頁 615 - 616); 国際公開第 200294852 号 (col 136 - 137); 国際公開第 200238766 号 (請求項 3; 頁 133); 国際公開第 200224909 号 (実施例 3; 図 3);

相互参照: MIM: 606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

10

【0109】

(27) CD22 (B 細胞レセプター CD22 - B アイソフォーム, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Genbank 受託番号 AK026467);

Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; 国際公開第 2003072036 号 (請求項 1; 図 1);

相互参照: MIM: 107266; NP_001762.1; NM_001771_1

【0110】

(28) CD79a (CD79A, CD79, 免疫グロブリン関連アルファ (immuno globulin-associated alpha), 免疫グロブリンベータ (CD79B) と共有結合性に相互作用し、IgM 分子と表面上で複合体を形成し、B 細胞分化に関与するシグナルを伝達する B 細胞特異的タンパク質), 等電点: 4.84, 分子量: 25028 TM: 2 [P] 遺伝子染色体: 19q13.2, Genbank 受託番号 NP_001774.10) 国際公開第 2003088808 号, 米国特許出願公開第 20030228319 号; 国際公開第 2003062401 号 (請求項 9); 米国特許出願公開第 2002150573 号 (請求項 4, 頁 13 - 14); 国際公開第 9958658 号 (請求項 13, 図 16); 国際公開第 9207574 号 (図 1); 米国特許第 5644033 号; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2):633-637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

20

【0111】

(29) CXCR5 (バーキットリンパ腫レセプター 1 は、CXCL13 ケモカインによって活性化され、リンパ球遊走及び体液性防御において機能し、HIV-2 感染、おそらくエイズ、リンパ腫、骨髄腫、及び白血病の発症において役割を果たす、G タンパク質共役型受容体); 372 アミノ酸, 等電点: 8.54 分子量: 41959 TM: 7 [P] 遺伝子染色体: 11q23.3, Genbank 受託番号 NP_001707.1) 国際公開第 2004040000 号; 国際公開第 2004015426 号; 米国特許出願公開第 2003105292 号 (実施例 2); 米国特許第 6555339 号 (実施例 2); 国際公開第 200261087 号 (図 1); 国際公開第 200157188 号 (請求項 20, 頁 269); 国際公開第 200172830 号 (頁 12 - 13); 国際公開第 200022129 号 (実施例 1, 頁 152 - 153, 実施例 2, 頁 254 - 256); 国際公開第 9928468 号 (請求項 1, 頁 38); 米国特許第 5440021 号 (実施例 2, col 49 - 52); 国際公開第 9428931 号 (頁 56 - 58); 国際公開第 9217497 号 (請求項 7, 図 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779;

30

【0112】

(30) HLA-DOB (ペプチドを結合しそれらを CD4 + T リンパ球に提示する MHC クラス II 分子 (Ia 抗原) のベータサブユニット); 273 アミノ酸, 等電点: 6.56 分子量: 30820 TM: 1 [P] 遺伝子染色体: 6p21.3, Genba

40

50

n k 受託番号 N P _ 0 0 2 1 1 1 . 1)

Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; 国際公開第 9 9 5 8 6 5 8 号 (請求項 13, 図 15) ; 米国特許第 6 1 5 3 4 0 8 号 (C o l 3 5 - 3 8) ; 米国特許第 5 9 7 6 5 5 1 号 (c o l 1 6 8 - 1 7 0) ; 米国特許第 6 0 1 1 1 4 6 号 (c o l 1 4 5 - 1 4 6) ; Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119;

10

【 0 1 1 3 】

(3 1) P 2 X 5 (プリンレセプター P 2 X リガンド開口型イオンチャネル 5 は、細胞外 A T P により開閉されるイオンチャネルであり、シナプス伝達及び神経発生に関与する可能性があり、欠乏は、特発性排尿筋不安定性の病態生理の一因となり得る ; 4 2 2 アミノ酸) , 等電点 : 7 . 6 3 , 分子量 : 4 7 2 0 6 T M : 1 [P] 遺伝子染色体 : 1 7 p 1 3 . 3 , G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 2 5 5 2 . 2)

Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; 国際公開第 2 0 0 4 0 4 7 7 4 9 号 ; 国際公開第 2 0 0 3 0 7 2 0 3 5 号 (請求項 10) ; Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; 国際公開第 2 0 0 2 2 2 6 6 0 号 (請求項 20) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 9 3 4 4 4 号 (請求項 1) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 7 7 6 8 号 (請求項 1) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 2 9 2 7 7 号 (頁 8 2) ;

20

【 0 1 1 4 】

(3 2) C D 7 2 (B 細胞分化抗原 C D 7 2 , L y b - 2) PROTEIN SEQUENCE Full maeaity...tafrfpd (1 . . 3 5 9 ; 3 5 9 アミノ酸) , 等電点 : 8 . 6 6 , 分子量 : 4 0 2 2 5 T M : 1 [P] 遺伝子染色体 : 9 p 1 3 . 3 , G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 1 7 7 3 . 1)

国際公開第 2 0 0 4 0 4 2 3 4 6 号 (請求項 6 5) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 2 6 4 9 3 号 (頁 5 1 - 5 2 , 5 7 - 5 8) ; 国際公開第 2 0 0 0 7 5 6 5 5 号 (頁 1 0 5 - 1 0 6) ; Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;

30

【 0 1 1 5 】

(3 3) L Y 6 4 (リンパ球抗原 6 4 (R P 1 0 5) , ロイシンリッチリピート (L R R) ファミリーの I 型膜タンパク質であり、 B 細胞の活性化及びアポトーシスを制御し、機能喪失は全身性エリテマトーデスの患者における疾患活性の上昇に関連する) ; 6 6 1 アミノ酸 , 等電点 : 6 . 2 0 , 分子量 : 7 4 1 4 7 T M : 1 [P] 遺伝子染色体 : 5 q 1 2 , G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 0 5 5 7 3 . 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 2 1 9 3 5 6 7 号 ; 国際公開第 9 7 0 7 1 9 8 号 (請求項 1 1 , 頁 3 9 - 4 2) ; Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 3 0 4 7 号 ; 国際公開第 9 7 4 4 4 5 2 号 (請求項 8 , 頁 5 7 - 6 1) ; 国際公開第 2 0 0 0 1 2 1 3 0 号 (頁 2 4 - 2 6) ;

40

【 0 1 1 6 】

(3 4) F c R H 1 (F c レセプター様タンパク質 1 , C 2 タイプ I g 様ドメイン及び I T A M ドメインを含む免疫グロブリン F c ドメインについての推定上のレセプターであり、 B - リンパ球分化において役割を有し得る) ; 4 2 9 アミノ酸 , 等電点 : 5 . 2 8 , 分子量 : 4 6 9 2 5 T M : 1 [P] 遺伝子染色体 : 1 q 2 1 - 1 q 2 2 , G e n b a n k 受託番号 N P _ 4 4 3 1 7 0 . 1)

国際公開第 2 0 0 3 0 7 7 8 3 6 号 ; 国際公開第 2 0 0 1 3 8 4 9 0 号 (請求項 6 , 図 1 8 E - 1 - 1 8 - E - 2) ; Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 9 6 2 4 号 (請求項 8) ; 欧州特許第 1 3 4 7 0 4 6 号 (請求項 1) ; 国際公開第 2 0 0 3 0 8 9 6 2 4 号 (請求項 7) ;

50

【0117】

(35) I R T A 2 免疫グロブリンスーパーファミリー-レセプタートransロケーション関連2 (Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2)、B細胞発生及びリンパ腫形成において役割を有し得る推定上の免疫レセプター；一部のB細胞悪性腫瘍においてtransロケーションによる遺伝子の調節解除が発生する)；977アミノ酸，等電点：6.88 分子量：106468 TM：1 [P] 遺伝子染色体：1q21, Genbank受託番号Human: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1

10

国際公開第2003024392号(請求項2, 図97)； Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; 国際公開第2003077836号；国際公開第200138490号(請求項3, 図18B-1-18B-2)；

【0118】

(36) T E N B 2 (T M E F F 2, tomoregulin, T P E F, H P P 1, T R, 増殖因子のEGF/ヘレグリンファミリー及びフォリスタチンに関連する推定上の膜貫通型ブロテオグリカン)；374アミノ酸, N C B I 受託番号: A A D 5 5 7 7 6, A A F 9 1 3 9 7, A A G 4 9 4 5 1, N C B I RefSeq: N P _ 0 5 7 2 7 6; N C B I Gene: 2 3 6 7 1; OMIM: 6 0 5 7 3 4; SwissProt Q 9 U I K 5; Genbank受託番号A F 1 7 9 2 7 4; A Y 3 5 8 9 0 7, C A F 8 5 7 2 3, C Q 7 8 2 4 3 6

20

国際公開第2004074320号(配列番号810)；特開2004-113151号公報(配列番号2, 4, 8)；国際公開第2003042661号(配列番号580)；国際公開第2003009814号(配列番号411)；欧州特許第1295944号(頁69-70)；国際公開第200230268号(頁329)；国際公開第200190304号(配列番号2706)；米国特許出願公開第2004249130号；米国特許出願公開第2004022727号；国際公開第2004063355号；米国特許出願公開第2004197325号；米国特許出願公開第2003232350号；米国特許出願公開第2004005563号；米国特許出願公開第2003124579号；Horie et al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84;

30

【0119】

(37) P M E L 1 7 (シルバーホモログ(silver homolog); S I L V; D 1 2 S 5 3 E; P M E L 1 7; (S I); (S I L); M E 2 0; g p 1 0 0) B C 0 0 1 4 1 4; B T 0 0 7 2 0 2; M 3 2 2 9 5; M 7 7 3 4 8; N M _ 0 0 6 9 2 8; McGlinchey, R.P. et al (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (33), 13731-13736; Kummer, M.P. et al (2009) J. Biol. Chem. 284 (4), 2296-2306;

【0120】

(38) T M E F F 1 (EGF様及び2つのフォリスタチン様ドメインを有する膜貫通型タンパク質1; Tomoregulin-1; H 7 3 6 5; C 9 o r f 2; C 9 O R F 2; U 1 9 8 7 8; X 8 3 9 6 1) N M _ 0 8 0 6 5 5; N M _ 0 0 3 6 9 2; Harms, P.W. (2003) Genes Dev. 17 (21), 2624-2629; Gery, S. et al (2003) Oncogene 22 (18):2723-2727;

40

【0121】

(39) G D N F - R a 1 (G D N F ファミリー-レセプター-アルファ1; G F R A 1; G D N F R; G D N F R A; R E T L 1; T R N R 1; R E T 1 L; G D N F R - アルファ1; G F R - A L P H A - 1; U 9 5 8 4 7; B C 0 1 4 9 6 2; N M _ 1 4 5 7 9 3) N M _ 0 0 5 2 6 4; Kim, M.H. et al (2009) Mol. Cell. Biol. 29 (8), 2264-2277; Treanor, J.J. et al (1996) Nature 382 (6586):80-83;

【0122】

50

(40) Ly6E (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E; Ly67, RIG-E, SC A-2, TSA-1) NP_002337.1; NM_002346.2; de Nooij-van Dalen,A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6), 768-774; Zammit,D.J. et al (2002) Mol. Cell. Biol. 22 (3):946-952;

【0123】

(41) TMEM46 (シガホモログ(shisa homolog)2 (アフリカツメガエル); SHISA2) NP_001007539.1; NM_001007538.1; Furushima,K. et al (2007) Dev. Biol. 306 (2), 480-492; Clark,H.F. et al (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270;

【0124】

(42) Ly6G6D (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G6D; Ly6-D, MEG T1) NP_067079.2; NM_021246.2; Mallya, M. et al (2002) Genomics 80 (1):113-123; Ribas,G. et al (1999) J. Immunol. 163 (1):278-287;

【0125】

(43) LGR5 (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体5; GPR49, GPR67) NP_003658.1; NM_003667.2; Salanti,G. et al (2009) Am. J. Epidemiol. 170 (5):537-545; Yamamoto,Y. et al (2003) Hepatology 37 (3):528-533;

【0126】

(44) RET (retプロトオンコジーン; MEN2A; HSCR1; MEN2B; MTC1; (PTC); CDHF12; Hs.168114; RET51; RET-EL E1) NP_066124.1; NM_020975.4; Tsukamoto,H. et al (2009) Cancer Sci. 100 (10):1895-1901; Narita,N. et al (2009) Oncogene 28 (34):3058-3068;

【0127】

(45) LY6K (リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K; LY6K; HSJ001348; FLJ35226) NP_059997.3; NM_017527.3; Ishikawa, N. et al (2007) Cancer Res. 67 (24):11601-11611; de Nooij-van Dalen,A.G. et al (2003) Int. J. Cancer 103 (6):768-774;

【0128】

(46) GPR19 (Gタンパク質共役型受容体19; Mm.4787) NP_006134.1; NM_006143.2; Montpetit, A. and Sinnott,D. (1999) Hum. Genet. 105 (1-2):162-164; O'Dowd, B.F. et al (1996) FEBS Lett. 394 (3):325-329;

【0129】

(47) GPR54 (KISS1レセプター; KISS1R; GPR54; HOT7T 175; AXOR12) NP_115940.2; NM_032551.4; Navenot, J.M. et al (2009) Mol. Pharmacol. 75 (6):1300-1306; Hata, K. et al (2009) Anticancer Res. 29 (2):617-623;

【0130】

(48) ASPHD1 (アスパラギン酸-ヒドロキシラーゼドメイン含有1; LOC253982) NP_859069.2; NM_181718.3; Gerhard, D.S. et al (2004) Genome Res. 14 (10B):2121-2127;

【0131】

(49) チロシナーゼ (TYR; OCAIA; OCA1A; チロシナーゼ; SHEP3) NP_000363.1; NM_000372.4; Bishop,D.T. et al (2009) Nat. Genet. 41 (8):920-925; Nan, H. et al (2009) Int. J. Cancer 125 (4):909-917;

【0132】

(50) TMEM118 (リングフィンガータンパク質, 膜貫通型2; RNF2; FLJ14627) NP_001103373.1; NM_001109903.1; Clark, H.F. et al (2003) Genome Res. 13 (10):2265-2270; Scherer,S.E. et al (2006) N

10

20

30

40

50

ature 440 (7082):346-351

【0133】

(51) G P R 1 7 2 A (Gタンパク質共役型受容体 1 7 2 A ; G P C R 4 1 ; F L J 1 1 8 5 6 ; D 1 5 E r t d 7 4 7 e) N P _ 0 7 8 8 0 7 . 1 ; N M _ 0 2 4 5 3 1 . 3 ; Ericsson, T.A. et al (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11):6759-6764; Takeda, S. et al (2002) FEBS Lett. 520 (1-3):97-101.

【0134】

親抗体はまた、アルブミン結合ペプチド (ABP) 配列を有する融合タンパク質であってもよい(Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; 国際公開第 01/45746号)。本発明の抗体は、(i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, 頁 35038; (ii) 米国特許出願公開第 20040001827号 の[0076]配列番号: 9-22; 及び(iii) 国際公開第 01/45746号の 頁 12-13, 配列番号: z1-z14に記載のABP配列を有する融合タンパク質を含み、その全てが参照により本明細書に援用される。

【0135】

変異誘発

出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体をコードするDNAは、当技術分野で公知の種々の方法により調製される。これらの方法は、前に調製した、ポリペプチドをコードするDNAの部位特異的（またはオリゴスクレオチド介在性）変異誘発、PCR変異誘発、及びカセット変異誘発による調製を含むがこれらに限定されない。組換え抗体の変異体は、制限断片の操作によって、または合成オリゴスクレオチドとの重複伸長PCRによっても構築されうる。変異誘発プライマーは、システインのコドンの置換をコードする。標準的な変異誘発法が、そのような変異システイン変換抗体をコードするDNAを生成するため用いることができる。一般的なガイダンスはSambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及びAusubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993に見出すことができる。

【0136】

部位特異的変異誘発法は、置換変異体、すなわち変異タンパク質を作製するための一つの方法である。この手法は当技術分野でよく知られている（例えばCarter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; and Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488）を参照）。簡単に言うと、DNAの部位特異的変異誘発を実施する際に、出発DNAは、望ましい変異をコードするオリゴスクレオチドをその出発DNAの一本鎖に最初にハイブリダイズすることで変換される。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼは、プライマーとしてハイブリダイズされたオリゴスクレオチドを使用し、テンプレートとして出発DNAの一本鎖を使用して、第二鎖全体を合成するために使用される。従って、望まれる変異をコードするオリゴスクレオチドが得られた二本鎖DNAに組み込まれる。部位特異的変異誘発法は、変異を誘発されるべきタンパク質を発現プラスミド内で発現する遺伝子内で行うことができ、得られたプラスミドは配列が決定され、望まれるシステイン置換変異生成の導入を確認する(Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)。部位特異的プロトコールや形式は市販に入手可能なものの、例えばQuick Change（登録商標）多重部位特異的変異生成キット（ストラタジーン、ラホーヤ、カリフォルニア州）を含む。

【0137】

PCR突然変異誘発はまた、出発ポリペプチドのアミノ酸配列変異体を作るのに適している。Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; 及びVallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733を参照。簡単に説明すると、PCRにおける出発物質としてテンプレートDNAの少量が用いられる場合、テンプレートDNA

10

20

30

40

50

の対応する領域とは配列が若干異なるプライマーが、プライマーがテンプレートとは異なる場所においてのみ、テンプレート配列とは異なる特異的DNA断片の比較的多量を產生するために用いることができる。

【0138】

変異体を調製するための別の方法であるカセット式変異誘発は、Wells et al (1985) Gene 34:315-323により記載される技術にもとづく。出発材料は、変異されるべき出発ポリペプチドを含むプラスミド（又は他のベクター）である。変異されるべき出発DNAのコドンが同定される。同定された変異部位のそれぞれの側にユニークな制限エンドヌクレアーゼ部位が存在する必要がある。そのような制限酵素部位が存在しない場合、それらは出発ポリペプチドDNAの適切な場所でそれらを導入するために、上記オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発法を用いて生成される場合がある。プラスミドDNAは、それを線形化するために、これらの部位で切断される。制限部位間のDNAの配列をコードするが、望まれる変異を含む二本鎖オリゴヌクレオチドは、標準的な手順を用いて合成され、ここでオリゴヌクレオチドの二本鎖は別々に合成され、標準的な技術を用いて一緒にハイブリダイズされる。この二本鎖オリゴヌクレオチドは、カセットと呼ばれる。このカセットは、それが直接プラスミドにライゲーションすることができるよう、線状プラスミドの両端と一致する5'及び3'の両端を持つように設計されている。このプラスミドは、今や変異DNA配列を含む。コードされたシステインの置換を含む変異体DNAは、DNA配列決定により確認することができる。

【0139】

単一の変異はまた、PCRに基づく変異誘発によって、テンプレートとして二本鎖プラスミドDNAを用いたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって生成される (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。

【0140】

本発明において、M13ファージ上に提示されたhu4D5Fabv8が(Gerstner et al (2002) "Sequence Plasticity In The Antigen-Binding Site Of A Therapeutic Anti-HER2 Antibody", J Mol Biol. 321:851-62)、モデル系として実験に用いられた。システイン変異が、hu4D5Fabv8-ファージ、hu4D5Fabv8、及びABP-hu4D5Fabv8のコンストラクトにおいて導入された。hu4D5-Thiophenylab-Fab-ファージプレップは、前述のようにポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を用いて行った(Lowman, Henry B. (1998) Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey) 87 (Combinatorial Peptide Library Protocols) 249-264)。

【0141】

オリゴヌクレオチドは、ホスホラミダイトの合成方法によって調製される（米国特許第4415732号、米国特許第4458066号；Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311）。ホスホロアミダイト法は、オリゴヌクレオチド鎖に反応性の3'ホスホロアミダイト成分を持つヌクレオチドモノマー単位の周期的な付加を伴い、制御された細孔ガラスで構成される固体支持体又は高度に架橋されたポリスチレン上で、最も一般的には3'末端ヌクレオシドが合成の開始時に固相支持体に結合されて、3'から5'の方向に成長させる（米国特許第5047524号；米国特許第5262530号）。本方法は、通常、自動化された市販のシンセサイザ-（アプライドバイオシステムズ、フォスター・シティ、カリフォルニア州）を用いて実践される。オリゴヌクレオチドは、検出、捕獲、安定化、又は他の目的のため非同位体成分で化学的に標識することができる(Andrus, A. "Chemical methods for 5' non-isotopic labelling of PCR probes and primers" (1995) in PCR 2: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, pp. 39-54; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671; Keller, G. and Manak, M. in DNA Probes Second Editi

10

20

30

40

50

on (1993), Stockton Press, New York, pp. 121-23)。

【0142】

P H E S E L E C T O R アッセイ

P H E S E L E C T O R (反応性チオールの選択のためのファージ E L I S A) アッセイは、 E L I S A ファージ形式で抗体の反応性システイン群の検出を可能にする(米国特許第 7 5 2 1 5 4 1 号; Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" J Immunol Methods 2008;332:41-52)。ウエル表面で目的のタンパク質(例えば抗体)をコーティングし、ファージ粒子、次いで H R P 標識された吸光度検出 2 次抗体と共にインキュベートする方法が実施例 2 に詳述される。ファージ上に提示された変異体タンパク質は、急速、堅牢でかつハイスループットな方法でスクリーニングすることができる。システイン改変抗体のライブラリーが生成され、同じアプローチを用いた結合選択に供され、抗体又は他のタンパク質のランダムなタンパク質ファージライブラリーに由来する遊離の C y s を取り込んだ反応部位を適切に同定することができる。また、この手法は、チオール反応性でもある親和性試薬またはレポーター基をファージ上に提示されたシステイン変異体タンパク質を反応させることを含む。図 8 は、 P H E S E L E C T O R アッセイについて、 F a b 又は T h i o F a b の H E R 2 への結合(上)及びビオチン標識化 T h i o F a b のストレプトアビジンへの結合(下)を描いた模式図により示す。

10

【0143】

タンパク質発現・精製

20

システイン改変された抗体をコードする D N A は容易に単離され、従来の手順を使用して配列決定される(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。ハイブリドーマ細胞は、 D N A の供給源として機能する。ひとたび単離されると、 D N A は、発現ベクター中に置かれ、次いで本来ならば抗体タンパク質を生産しない、例えば大腸菌細胞、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞などの宿主細胞、又は他の哺乳動物の宿主細胞、例えば骨髄腫細胞(米国特許第 5 8 0 7 7 1 5 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 4 8 5 7 2 号; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 2 2 9 3 1 0 号)にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得ることができる。 h u 4 D 5 F a b v 8 システイン改変抗体の収率は野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 と類似していた。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現に関する総説として、 Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 and Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188 が含まれる。

30

【0144】

設計及び選択の後、反応性の高い不対 C y s 残基を持つシステイン改変抗体、例えば T h i o F a b は、(i) 大腸菌などの細菌系、又は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)等の哺乳動物細胞培養系(国際公開第 0 1 / 0 0 2 4 5 号)における発現、及び(ii) 一般的なタンパク質精製技術を使用しての精製により(Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988)生成され得る。 T h i o F a b は 3 4 B 8 、非サブレッサー E . c o l i 株にて誘導によって発現させた(Baca et al (1997) Journal Biological Chemistry 272(16):10678-84)。実施例 3 a を参照。収穫細胞ペレットを P B S (リン酸緩衝生理食塩水)に再懸濁し、全細胞溶解は、マイクロフルイダイザーを通過させることで行い、 T h i o F a b は、プロテイン G S E P H A R O S E T M (アマシャム社製)による親和性クロマトグラフィーにより精製した。 T h i o F a b は、上述のようにビオチン-P E O-マレイミドと結合され、ビオチン標識化 T h i o F a b は更に S u p e r d e x - 2 0 0 T M (アマシャム) ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製され、遊離ビオチン-P E O-マレイミド及び T h i o F a b のオリゴマー画分を除去した。

40

【0145】

質量分析

液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析(L C - E S I - M S) 分

50

析が、ビオチン結合 F a b の正確な分子量測定のために使用された(Cole, R.B. *Electro Spray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation And Applications*. (1997) Wiley, New York)。ビオチン化 h u 4 D 5 F a b v 8 (A 1 2 1 C) ペプチドのアミノ酸配列は、トリプシン消化に続いて L C - E S I - タンデム M S 分析(表 4、実施例 3 b)によって決定された。

【 0 1 4 6 】

抗体 F a b 断片 h u 4 D 5 F a b v 8 1 0 は 1 0 個の C y s 残基(5 個が軽鎖、 5 個が重鎖)を含む約 4 4 5 アミノ酸残基を含有する。ヒト 4 D 5 可変断片(F v 4 D 5)の高分解能構造が確立されており、 Eigenbrot et al “ X-Ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized Anti-P185her2 Antibody 4D5 And Comparison With Molecular Modeling ” (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995)を参照。すべての C y s 残基がジスルフィド結合の形で存在し、したがって、これらの残基は、(還元剤で処理していない限り)ジルコニウム - マレイミドと結合するための、任意の反応性チオール基を持たない。したがって、新たに改変された C y s 残基は不対のままで、求電子性リンカー試薬又はジルコニウムリンカ - 中間体、例えばジルコニウム - マレイミドと反応する、すなわち結合することができる。図 1 A は X 線結晶座標に由來した h u 4 D 5 F a b v 8 抗体断片の 3 次元表示を示す。重鎖及び軽鎖の改変された C y s 残基の位置は連続する番号付けに従って番号がついている。図 1 B によるトラスツズマブの 4 d 5 v 7 f a b H 变異体において、この連続番号システムは、 K a b a t の番号付けシステムに相關し(Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、 N 末端で開始した連続番号方式(上の行)を示し、 a 、 b 、 c で記された挿入によって K a b a t の番号付け方式(下の行)とは異なる。 K a b a t の番号付け方式を使用して、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインの F R または C D R への短縮、または挿入に対応して減少したり又は増加したアミノ酸を含み得る。システインが改変された重鎖变異体の部位は、以下のチャートにある連続番号付け方式及び K a b a t の番号付け方式により同定される。

4D5Fab 重鎖变異体	配列番号	Kabat の番号付け
A40C	Ala-40	Ala-40
A88C	Ala-88	Ala-84
S119C	Ser-119	Ser-112
S120C	Ser-120	Ser-113
A121C	Ala-121	Ala-114
S122C	Ser-122	Ser-115
A175C	Ala-175	Ala-168

【 0 1 4 7 】

M 1 3 ファージミド - C y s 变異体の F a b (図 3 A 及び図 3 B) は F a b タンパク質に比べて迅速にスクリーニングすることができる。抗原及びストレプトアビジンへのファージミド - T h i o F a b の結合は、 E L I S A プレート上にそれぞれ H E R 2 およびストレプトアビジンをコーティングし、続いて実施例 2 に記載され図 8 に示すように、抗 F a b - H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ) で探査することで試験することができる。この方法は、抗原結合の作用及び改変 C y s 残基 / 結合型ビオチン分子によるチオール基の反応性の同時モニタリングを可能にした。また、この方法は、 M 1 3 ファージ上に提示された任意のタンパク質に対して反応性チオール基をスクリーニングするために適用することができる。結合型または非結合型ファージミド - T h i o F a b は、単純な P E G 沈殿により精製される。

【 0 1 4 8 】

ヒト化 4 D 5 (h u 4 D 5 F a b) の抗原結合断片は大腸菌で良好に発現され、バクテリオファージに提示される(Garrard et al (1993) *Gene* 128:103-109)。抗体 F a b 断片

10

20

30

40

50

h u 4 D 5 F a b v 8 は、チオール反応性を探査するための E L I S A に基づくアッセイにおけるモデルシステムとして M 1 3 ファージ上に提示された。図 8 は、ビオチン標識化 Th i o F a b ファージ、及び H E R 2 (上) 及びストレプトアビジン (下) に対する抗ファージ H R P 抗体の結合を描いた P H E S E L E C T O R アッセイのグラフィック表現である。5 個のアミノ酸残基 (L-A l a 4 3, H-A l a 4 0, H-S e r 1 1 9, H-A l a 1 2 1 及び H-S e r 1 2 2) が抗原結合表面から離れているとして最初に結晶構造情報から選択された (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。タンパク質データベースの X 線結晶構造は 1 F V C として指定された。C y s 残基が部位特異的突然変異誘発によってこれらの位置で改変された。Th i o F a b ファージ調製物が単離され、ビオチン化試薬と反応させた。

10

【 0 1 4 9 】

ビオチン結合型及び非結合型変異体は、H E R 2 及びストレプトアビジン結合に関して H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 標識抗ファージ抗体を用いた E L I S A にもとづく P H E S E L E C T O R アッセイ (図 8、実施例 2) を用いて試験した。非ビオチン化したファージ h u 4 D 5 F a b v 8 (図 2 A) 及びビオチン化ファージ h u 4 D 5 F a b v 8 (図 2 B) の B S A (オープンボックス)、H E R 2 (グレーボックス) またはストレプトアビジン (ソリッドボックス) との相互作用は、抗 M 1 3 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 抗体を介する標準的な H R P 反応を開発し、4 5 0 n m の吸光度を測定することによりモニタリングされた。発色基質の代謝回転によって生成された吸光度を 4 5 0 n m で測定した。Th i o F a b の H E R 2 との反応性は抗原結合を測定する。Th i o F a b のストレプトアビジンとの反応性は、ビオチン化の程度を測定する。Th i o F a b の B S A との反応性は、非特異的な相互作用に対する負の制御である。図 2 A に示すように、すべての Th i o F a b - ファージ変異体は野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 ファージと比べて H E R 2 に対する類似の結合を持っている。さらに、ビオチンとの結合は、H E R 2 に結合する Th i o F a b に干渉しない (図 2 B)。

20

【 0 1 5 0 】

驚くべきことにつかう予期せずに、Th i o F a b ファージサンプルはストレプトアビジン結合活性のさまざまな値を示した。試験された全てのファージ Th i o F a b から、A 1 2 1 C システイン改変抗体が最大のチオール反応性を示した。野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 ファージは、ビオチン - マレイミドの同量でインキュベートしたにもかかわらず、これらのファージは、少ししかストレプトアビジンに結合せず、h u 4 D 5 F a b v 8 及び M 1 3 ファージコートタンパク質由来の既存のシスティン残基 (ジスルフィド結合形成に関与する) がビオチン - マレイミドの部位特異的結合を妨げないことを示唆している。これらの結果はファージ E L I S A アッセイが、F a b 表面上の反応性チオール基をスクリーニングするために首尾良く使用できることを示している。

30

【 0 1 5 1 】

P H E S E L E C T O R アッセイは、抗体の反応性チオール基のスクリーニングを可能とする。この方法による A 1 2 1 C 変異体の同定が例示である。F a b 分子全体を反応性チオール基を持つより多くの Th i o F a b 変異体を特定するために効果的に検索することができる。パラメータとして、部分的表面接触性が、ポリペプチドのアミノ酸残基への溶媒の接触性を同定、定量するために採用された。表面接触性は、溶媒分子、すなわち水により接触され得る表面積 (A²) として表される。水の占有空間は、1.4 半径の球として近似される。ソフトウェアは、既知の X 線結晶由来座標を持つタンパク質の個々のアミノ酸の表面接触性を計算するアルゴリズムを用いる結晶学プログラムの C C P 4 一式として ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763)、自由に利用又はライセンス可能である (CCP4 の秘書, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, 又はインターネットによる: www ccp4 ac uk dist html INDEX html)。表面接触性の計算を実行する 2 つの典型的なソフトウェアモジュールは、B. Lee and F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400 のアルゴリズムにもとづく「 A R E A I M O L 」及び「 S U R F A C E 」であ

40

50

る。AREAIMOLは、プローブ球（溶媒分子を表す）がタンパク質のファンデルワールス表面を転がるときの、その中心の軌跡として、タンパク質の溶媒接触可能表面を定義する。AREAIMOLは、各原子に関する拡張球（原子とプローブの半径の和に等しい原子の中心からの距離で）上の表面点を生成し、隣接する原子に関連付けられている等価な球の中にあるものを排除することで、溶媒接触可能表面積を計算する。AREAIMOLは、PDBの座標ファイルの原子の溶媒接触可能な面積を見いだし、残基ごと、鎖ごと及び全体の分子に対して接触可能面積をまとめている。個々の原子の接触可能面積（または面積の違いは）擬似PDB出力ファイルに書き込むことができる。AREAIMOLは、各要素に单一の半径を想定し、異なる要素の限られた数を認識するだけである。未知の原子の種類（すなわちAREAIMOLの内部データベース内に無いもの）は1.8 のデフォルトの半径が割り当てられる。認識される原子の一覧は以下である。 10

原子	原子番号	ファンデルワールス半径(Å)
C	6	1.80
N	7	1.65
O	8	1.60
Mg	12	1.60
S	16	1.85
P	15	1.90
Cl	17	1.80
Co	27	1.80

【0152】

AREAIMOL及びSURFACEは絶対的な接触性、すなわち平方オングストローム(Å²)を報告する。部分的表面接触性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関連する基準状態を参照することにより計算される。基準状態はトリペプチドGly-X-Glyであり、ここで、Xは、目的のアミノ酸であり、基準状態は、「拡張した」コンフォメーション、すなわち -ストランドにおけるようなものである必要がある。拡張されたコンフォメーションは、Xの接触性を最大限にする。計算された接触可能な面積をGly-X-Glyトリペプチド基準状態における接触可能面積で割ってその商が報告され、それが部分的接触性である。パーセント接触性は、100を乗じた部分的接触性である。 20

【0153】

表面の接触性を計算するための別の典型的なアルゴリズムは、プログラムxscaleのSOLVモジュールに基づき(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)、ポリペプチドのX線座標に基づいて水の球に対するアミノ酸残基の部分的接触性を計算する。 30

【0154】

h u 4 D 5 F a b v 7内のすべてのアミノ酸の部分的表面接触性は、結晶構造情報を用いて計算した(Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。h u 4 D 5 F a b v 7の軽鎖及び重鎖のアミノ酸の部分的表面接触性の値を表1に降順で表示する。 40

【0155】

表1

hu4D5Fabv7-輕鎖

SER A	202	frac acc=	101.236	ASP A	151	frac acc=	41.586	
GLY A	41	frac acc=	90.775	SER A	12	frac acc=	40.633	
GLY A	157	frac acc=	88.186	ASN A	210	frac acc=	40.158	
ASP A	1	frac acc=	87.743	SER A	63	frac acc=	39.872	
SER A	156	frac acc=	83.742	ARG A	66	frac acc=	39.669	
GLY A	57	frac acc=	81.611	PRO A	8	frac acc=	39.297	
SER A	168	frac acc=	79.680	SER A	65	frac acc=	39.219	
SER A	56	frac acc=	79.181	SER A	77	frac acc=	38.820	10
LYS A	169	frac acc=	77.591	THR A	180	frac acc=	38.296	
SER A	60	frac acc=	75.291	ASP A	185	frac acc=	38.234	
THR A	109	frac acc=	74.603	THR A	31	frac acc=	38.106	
CYS A	214	frac acc=	72.021	THR A	94	frac acc=	37.452	
LYS A	126	frac acc=	71.002	THR A	93	frac acc=	37.213	
SER A	67	frac acc=	66.694	THR A	197	frac acc=	36.709	
ARG A	18	frac acc=	66.126	SER A	182	frac acc=	36.424	
ASN A	152	frac acc=	65.415	GLY A	128	frac acc=	35.779	
SER A	127	frac acc=	65.345	LYS A	207	frac acc=	35.638	
LYS A	190	frac acc=	65.189	ASP A	17	frac acc=	35.413	
LYS A	145	frac acc=	63.342	GLY A	200	frac acc=	35.274	
GLN A	199	frac acc=	62.470	GLU A	165	frac acc=	35.067	
GLU A	143	frac acc=	61.681	ALA A	112	frac acc=	34.912	
GLN A	3	frac acc=	59.976	GLN A	79	frac acc=	34.601	20
LYS A	188	frac acc=	59.680	VAL A	191	frac acc=	33.935	
ARG A	24	frac acc=	59.458	SER A	208	frac acc=	33.525	
PHE A	53	frac acc=	58.705	LYS A	39	frac acc=	33.446	
SER A	9	frac acc=	58.446	GLU A	123	frac acc=	32.486	
GLN A	27	frac acc=	57.247	THR A	69	frac acc=	32.276	
ALA A	153	frac acc=	56.538	SER A	76	frac acc=	32.108	
SER A	203	frac acc=	55.864	HIS A	189	frac acc=	31.984	
LYS A	42	frac acc=	54.730	ARG A	108	frac acc=	31.915	
GLY A	16	frac acc=	54.612	ASN A	158	frac acc=	31.447	
LYS A	45	frac acc=	54.464	VAL A	205	frac acc=	31.305	
PRO A	204	frac acc=	53.172	SER A	14	frac acc=	31.094	
GLU A	213	frac acc=	53.084	GLN A	155	frac acc=	30.630	
ALA A	184	frac acc=	52.556	GLU A	187	frac acc=	30.328	30
VAL A	15	frac acc=	52.460	ARG A	211	frac acc=	30.027	
SER A	7	frac acc=	51.936	LYS A	183	frac acc=	29.751	
LEU A	154	frac acc=	51.525	ASN A	138	frac acc=	29.306	
GLN A	100	frac acc=	51.195	ASP A	170	frac acc=	29.041	
SER A	10	frac acc=	49.907	SER A	159	frac acc=	27.705	
THR A	5	frac acc=	48.879	GLN A	147	frac acc=	27.485	
THR A	206	frac acc=	48.853	THR A	22	frac acc=	27.121	
ASP A	28	frac acc=	48.758	ALA A	43	frac acc=	26.801	
GLY A	68	frac acc=	48.690	ARG A	142	frac acc=	26.447	
THR A	20	frac acc=	48.675	LEU A	54	frac acc=	25.882	
ASP A	122	frac acc=	47.359	ASP A	167	frac acc=	25.785	
PRO A	80	frac acc=	46.984	THR A	129	frac acc=	23.880	
SER A	52	frac acc=	46.917	ALA A	144	frac acc=	23.652	
SER A	26	frac acc=	46.712	VAL A	163	frac acc=	22.261	40
TYR A	92	frac acc=	46.218	PRO A	95	frac acc=	20.607	
LYS A	107	frac acc=	45.912	ALA A	111	frac acc=	19.942	
GLU A	161	frac acc=	45.100	LYS A	103	frac acc=	18.647	
VAL A	110	frac acc=	44.844	LEU A	181	frac acc=	18.312	
GLU A	81	frac acc=	44.578	THR A	72	frac acc=	18.226	
PRO A	59	frac acc=	44.290	GLU A	195	frac acc=	18.006	
ASN A	30	frac acc=	42.721	THR A	178	frac acc=	17.499	
GLN A	160	frac acc=	42.692	THR A	85	frac acc=	17.343	

SER A	114	frac acc=	42.374	ASP A	70	frac acc=	17.194
PRO A	40	frac acc=	41.928	LEU A	11	frac acc=	16.568
PHE A	116	frac acc=	16.406	LEU A	125	frac acc=	2.398
THR A	97	frac acc=	16.204	PRO A	96	frac acc=	2.387
ARG A	61	frac acc=	16.192	LEU A	47	frac acc=	2.180
TYR A	49	frac acc=	16.076	ALA A	51	frac acc=	1.837
SER A	50	frac acc=	15.746	PHE A	118	frac acc=	1.779
LYS A	149	frac acc=	15.510	PHE A	62	frac acc=	1.581
GLU A	55	frac acc=	14.927	ALA A	25	frac acc=	1.538
LEU A	201	frac acc=	14.012	VAL A	133	frac acc=	1.315
GLY A	64	frac acc=	13.735	ASP A	82	frac acc=	1.141
GLY A	212	frac acc=	13.396	LEU A	179	frac acc=	0.872
PHE A	98	frac acc=	12.852	GLN A	124	frac acc=	0.787
THR A	74	frac acc=	12.169	MET A	4	frac acc=	0.778
SER A	171	frac acc=	11.536	SER A	177	frac acc=	0.693
PRO A	141	frac acc=	11.073	SER A	131	frac acc=	0.693
PHE A	83	frac acc=	10.871	LEU A	135	frac acc=	0.654
THR A	164	frac acc=	10.325	PHE A	71	frac acc=	0.593
ALA A	32	frac acc=	9.971	TRP A	35	frac acc=	0.448
HIS A	198	frac acc=	9.958	PHE A	209	frac acc=	0.395
VAL A	146	frac acc=	9.861	TYR A	186	frac acc=	0.259
SER A	121	frac acc=	9.833	LEU A	78	frac acc=	0.157
ALA A	13	frac acc=	9.615	VAL A	196	frac acc=	0.000
GLU A	105	frac acc=	9.416	VAL A	132	frac acc=	0.000
SER A	162	frac acc=	9.304	VAL A	104	frac acc=	0.000
ILE A	117	frac acc=	8.780	VAL A	33	frac acc=	0.000
HIS A	91	frac acc=	8.557	VAL A	29	frac acc=	0.000
ALA A	193	frac acc=	8.547	TYR A	192	frac acc=	0.000
GLN A	37	frac acc=	8.442	TYR A	86	frac acc=	0.000
VAL A	58	frac acc=	8.281	TYR A	36	frac acc=	0.000
PRO A	120	frac acc=	8.095	THR A	102	frac acc=	0.000
GLN A	38	frac acc=	6.643	SER A	174	frac acc=	0.000
PRO A	113	frac acc=	6.594	PHE A	139	frac acc=	0.000
GLY A	101	frac acc=	6.558	LEU A	136	frac acc=	0.000
TYR A	140	frac acc=	5.894	LEU A	73	frac acc=	0.000
VAL A	115	frac acc=	5.712	ILE A	75	frac acc=	0.000
TYR A	87	frac acc=	4.539	ILE A	48	frac acc=	0.000
SER A	176	frac acc=	4.106	ILE A	21	frac acc=	0.000
ILE A	2	frac acc=	4.080	GLN A	90	frac acc=	0.000
ASN A	137	frac acc=	3.906	GLN A	89	frac acc=	0.000
TRP A	148	frac acc=	3.676	CYS A	194	frac acc=	0.000
GLY A	99	frac acc=	3.550	CYS A	134	frac acc=	0.000
PRO A	44	frac acc=	3.543	CYS A	88	frac acc=	0.000
LEU A	175	frac acc=	3.488	CYS A	23	frac acc=	0.000
VAL A	19	frac acc=	3.420	ALA A	130	frac acc=	0.000
ILE A	106	frac acc=	3.337	ALA A	84	frac acc=	0.000
PRO A	119	frac acc=	2.953	ALA A	34	frac acc=	0.000
LEU A	46	frac acc=	2.887				
GLN A	6	frac acc=	2.860				
TYR A	173	frac acc=	2.825				
VAL A	150	frac acc=	2.525				
GLN A	166	frac acc=	2.525				
THR A	172	frac acc=	2.436				

10

20

30

40

hu4D5Fabv7-重鎖

SER B	179	frac acc=	99.479	PRO B	14	frac acc=	45.729	
GLY B	42	frac acc=	95.850	THR B	54	frac acc=	45.503	
GLU B	1	frac acc=	87.276	THR B	200	frac acc=	45.369	
GLY B	66	frac acc=	84.541	LEU B	177	frac acc=	45.337	
ASP B	102	frac acc=	83.794	GLY B	8	frac acc=	44.898	
SER B	75	frac acc=	80.567	SER B	7	frac acc=	43.530	
GLY B	140	frac acc=	80.344	THR B	69	frac acc=	43.503	
ASN B	211	frac acc=	79.588	PRO B	220	frac acc=	43.378	
GLY B	197	frac acc=	78.676	LYS B	208	frac acc=	43.138	
ASP B	62	frac acc=	77.716	LYS B	30	frac acc=	42.380	10
GLY B	103	frac acc=	77.176	ALA B	23	frac acc=	41.952	
SER B	163	frac acc=	76.664	GLU B	46	frac acc=	41.430	
SER B	139	frac acc=	74.946	SER B	25	frac acc=	41.323	
LYS B	213	frac acc=	74.442	ARG B	87	frac acc=	41.282	
ALA B	165	frac acc=	74.339	LYS B	124	frac acc=	40.888	
THR B	167	frac acc=	73.934	ASN B	28	frac acc=	40.529	
SER B	122	frac acc=	72.870	GLN B	3	frac acc=	39.824	
SER B	194	frac acc=	71.959	THR B	123	frac acc=	39.306	
PRO B	41	frac acc=	71.540	SER B	63	frac acc=	38.867	
THR B	198	frac acc=	68.668	GLY B	56	frac acc=	38.582	
SER B	222	frac acc=	68.128	GLY B	169	frac acc=	38.469	
LYS B	43	frac acc=	67.782	THR B	172	frac acc=	38.421	
GLY B	26	frac acc=	67.782	PRO B	209	frac acc=	38.309	20
THR B	138	frac acc=	65.826	GLY B	101	frac acc=	38.040	
ASP B	31	frac acc=	64.222	TYR B	109	frac acc=	36.829	
GLY B	15	frac acc=	64.172	LYS B	221	frac acc=	36.520	
SER B	168	frac acc=	62.100	GLY B	44	frac acc=	35.147	
SER B	120	frac acc=	61.332	GLY B	181	frac acc=	34.735	
LYS B	76	frac acc=	61.092	THR B	58	frac acc=	34.457	
GLY B	141	frac acc=	59.419	GLY B	9	frac acc=	34.254	
SER B	137	frac acc=	59.179	VAL B	5	frac acc=	34.198	
TYR B	57	frac acc=	58.916	ALA B	121	frac acc=	33.049	
GLU B	89	frac acc=	58.483	SER B	127	frac acc=	32.390	
SER B	180	frac acc=	56.289	GLY B	10	frac acc=	32.230	
LYS B	65	frac acc=	55.044	SER B	71	frac acc=	30.659	
ASP B	215	frac acc=	54.656	ASP B	73	frac acc=	30.245	30
GLN B	13	frac acc=	53.719	LEU B	115	frac acc=	29.867	
GLN B	112	frac acc=	53.215	LEU B	11	frac acc=	29.825	
TYR B	105	frac acc=	51.940	ASN B	84	frac acc=	29.765	
ALA B	88	frac acc=	51.602	SER B	210	frac acc=	28.656	
GLY B	164	frac acc=	50.259	GLU B	155	frac acc=	28.162	
PRO B	192	frac acc=	49.826	SER B	160	frac acc=	26.526	
THR B	158	frac acc=	49.694	CYS B	223	frac acc=	26.270	
THR B	142	frac acc=	48.896	GLY B	16	frac acc=	26.158	
ASN B	55	frac acc=	48.344	ILE B	202	frac acc=	26.068	
LYS B	136	frac acc=	48.312	GLN B	82	frac acc=	25.836	
ARG B	19	frac acc=	48.082	SER B	193	frac acc=	25.550	
PRO B	156	frac acc=	47.366	ASN B	77	frac acc=	25.418	
PRO B	174	frac acc=	47.157	ARG B	59	frac acc=	25.301	40
LYS B	217	frac acc=	47.102	VAL B	93	frac acc=	25.254	
GLN B	199	frac acc=	46.650	THR B	74	frac acc=	24.902	
SER B	17	frac acc=	45.980	GLU B	219	frac acc=	24.778	
SER B	85	frac acc=	45.824	ASN B	206	frac acc=	24.647	

VAL B	170	frac acc=	24.549	PRO B	154	frac acc=	6.767	
TYR B	52	frac acc=	24.298	PRO B	133	frac acc=	6.767	
ALA B	175	frac acc=	23.804	TRP B	99	frac acc=	6.502	
LYS B	216	frac acc=	23.277	THR B	32	frac acc=	6.291	
VAL B	214	frac acc=	23.150	LEU B	45	frac acc=	4.649	
GLY B	125	frac acc=	22.802	VAL B	128	frac acc=	4.515	
ASN B	162	frac acc=	22.245	ILE B	51	frac acc=	4.307	10
ALA B	72	frac acc=	22.166	SER B	186	frac acc=	4.084	
ALA B	40	frac acc=	21.974	PHE B	173	frac acc=	3.969	
LEU B	18	frac acc=	20.273	ARG B	38	frac acc=	3.734	
THR B	212	frac acc=	20.170	TRP B	47	frac acc=	3.561	
LEU B	182	frac acc=	19.619	VAL B	118	frac acc=	3.409	
TYR B	33	frac acc=	19.398	ALA B	24	frac acc=	3.376	
THR B	190	frac acc=	19.365	TYR B	95	frac acc=	3.242	
VAL B	176	frac acc=	18.941	GLU B	6	frac acc=	3.216	
SER B	21	frac acc=	18.929	ALA B	144	frac acc=	3.167	
SER B	119	frac acc=	18.877	ILE B	70	frac acc=	1.958	
THR B	91	frac acc=	18.237	GLY B	111	frac acc=	1.868	
ASP B	151	frac acc=	17.849	LEU B	4	frac acc=	1.808	
THR B	114	frac acc=	17.601	TYR B	201	frac acc=	1.758	
SER B	134	frac acc=	17.571	LEU B	148	frac acc=	1.744	
LEU B	196	frac acc=	17.090	PHE B	68	frac acc=	1.708	
TYR B	60	frac acc=	16.575	VAL B	188	frac acc=	1.315	
TYR B	183	frac acc=	15.968	CYS B	22	frac acc=	0.935	
VAL B	2	frac acc=	15.901	TRP B	161	frac acc=	0.876	20
PRO B	130	frac acc=	15.342	LEU B	131	frac acc=	0.654	
LEU B	166	frac acc=	15.268	VAL B	205	frac acc=	0.495	
GLY B	100	frac acc=	15.003	ALA B	92	frac acc=	0.356	
PHE B	27	frac acc=	14.383	ALA B	79	frac acc=	0.356	
ASN B	204	frac acc=	13.873	VAL B	64	frac acc=	0.263	
PHE B	104	frac acc=	13.836	ILE B	29	frac acc=	0.227	
TYR B	80	frac acc=	13.490	VAL B	218	frac acc=	0.000	
VAL B	159	frac acc=	12.782	VAL B	189	frac acc=	0.000	
ARG B	67	frac acc=	12.362	VAL B	149	frac acc=	0.000	
GLN B	178	frac acc=	12.131	VAL B	116	frac acc=	0.000	
HIS B	171	frac acc=	11.412	VAL B	48	frac acc=	0.000	
SER B	184	frac acc=	11.255	VAL B	37	frac acc=	0.000	
ARG B	98	frac acc=	11.115	TYR B	152	frac acc=	0.000	30
PRO B	53	frac acc=	11.071	TYR B	94	frac acc=	0.000	
GLN B	39	frac acc=	11.037	TRP B	36	frac acc=	0.000	
SER B	195	frac acc=	10.909	SER B	187	frac acc=	0.000	
ASP B	108	frac acc=	10.525	SER B	97	frac acc=	0.000	
LEU B	185	frac acc=	10.464	MET B	107	frac acc=	0.000	
GLY B	113	frac acc=	10.406	MET B	83	frac acc=	0.000	
THR B	78	frac acc=	10.213	LEU B	145	frac acc=	0.000	
THR B	117	frac acc=	9.990	LEU B	86	frac acc=	0.000	
LYS B	150	frac acc=	9.447	LEU B	81	frac acc=	0.000	
VAL B	157	frac acc=	9.323	LEU B	20	frac acc=	0.000	
VAL B	12	frac acc=	9.207	ILE B	34	frac acc=	0.000	
TRP B	110	frac acc=	9.069	HIS B	207	frac acc=	0.000	
ALA B	143	frac acc=	8.903	HIS B	35	frac acc=	0.000	
SER B	135	frac acc=	8.897	GLY B	146	frac acc=	0.000	40
PHE B	129	frac acc=	8.895	CYS B	203	frac acc=	0.000	
ARG B	50	frac acc=	8.639	CYS B	147	frac acc=	0.000	
ALA B	61	frac acc=	8.547	CYS B	96	frac acc=	0.000	
ALA B	132	frac acc=	7.882	ASP B	90	frac acc=	0.000	
VAL B	191	frac acc=	7.366	ALA B	106	frac acc=	0.000	
PRO B	126	frac acc=	7.258	ALA B	49	frac acc=	0.000	
PHE B	153	frac acc=	6.918					

【0156】

次の2つの基準が、Cys残基と置換するために改変可能なhув4D5Fабv8の残基を同定するために適用された。

【0157】

1. 完全に埋め込まれているアミノ酸残基、すなわち10%未満の部分的表面接触性は除去された。表1は、10%以上接触可能である（部分的表面接触性）h u 4 D 5 F a b v 8 の 1 3 4 残基（軽鎖）及び 1 5 1 残基（重鎖）があることを示している。上位10の最も接触可能な S e r 、 A 1 a 及び V a 1 残基が他のアミノ酸に対して C y s に対するその構造上の近い類似性のため選択され、新たに改変された C y s により抗体に最小限の構造上の制約だけを導入している。他のシステインの置換部位をスクリーニングすることもでき、結合のために役に立つ可能性がある。

【 0 1 5 8 】

2. 残基は F a b の機能的及び構造的相互作用における役割に基づいて並べ替えられる。抗原の相互作用に関与せず、既存のジスルフィド結合から離れた残基がさらに選択された。新たに改変された C y s 残基は抗原結合とは異なり、かつ抗原結合に干渉せず、またジスルフィド結合形成に関与するシステインと誤対合すべきではない。

10

【 0 1 5 9 】

h u 4 D 5 F a b v 8 の以下の残基は上記の基準を持ち、 C y s に置換されるべく選択された： L - V 1 5 、 L - A 4 3 、 L - V 1 1 0 、 L - A 1 4 4 、 L - S 1 6 8 、 H - A 8 8 、 H - A 1 2 1 、 H - S 1 2 2 、 H - A 1 7 5 及び H - S 1 7 9 （図1に示す）。

【 0 1 6 0 】

チオール反応性は、任意の抗体に一般化することができ、アミノ酸の反応性システインアミノ酸との置換は、 L - 1 0 から L - 2 0 ； L - 3 8 から L - 4 8 ； L - 1 0 5 から L - 1 1 5 ； L - 1 3 9 から L - 1 4 9 ； L - 1 6 3 から L - 1 7 3 、から選択される軽鎖の範囲内で、及び、 H - 3 5 から H - 4 5 ； H - 8 3 から H - 9 3 ； H - 1 1 4 から H - 1 2 7 ；及び H - 1 7 0 から H - 1 8 4 、から選択される重鎖の範囲内で、及び H - 2 6 8 から H - 2 9 1 ； H - 3 1 9 から H - 3 4 4 ； H - 3 7 0 から H - 3 8 0 ；及び H - 3 9 5 から H - 4 0 5 から選択される範囲内の F c 領域で行われ得る。

20

【 0 1 6 1 】

チオール反応性はまた、軽鎖定常ドメイン（ C L ）および重鎖定常ドメインの C H 1 、 C H 2 及び C H 3 などの抗体の特定のドメインに対して一般化することができる。0.6以上のチオール反応性値をもたらすシステインの置換は、インタクトな抗体の重鎖定常ドメイン、 、 、 、 、及び μ : それぞれ I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g G 、及び I g M であり、 I g G サブクラスの I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g A 、及び I g A 2 を含む。

30

【 0 1 6 2 】

選択された 1 0 の C y s 変異は、抗原結合部位、例えば、このケースでは H E R 2 とのインターフェースから遠く離れていることが結晶構造データから明らかである。これらの変異体は、機能的相互作用における間接的な影響について実験的に試験することができる。すべての C y s F a b 変異体のチオール反応性が、実施例1及び2に記載され、表2に示すように測定され計算された。残基 L - V 1 5 C 、 L - V 1 1 0 C 、 H - A 8 8 C と H - A 1 2 1 C は、反応性があり安定したチオール基を有する（図3 A および図3 B ）。変異体 V 1 5 C 、 V 1 1 0 C 、 A 1 4 4 C 、 S 1 6 8 C は、軽鎖の C y s 変異体である。変異体 A 8 8 C 、 A 1 2 1 C 、 A 1 7 5 C 、 S 1 7 9 C は、重鎖の C y s 変異体である。高い部分的表面接触性を持つ部位が P H E S E L E C T O R アッセイ（表2）によって計算されるように、最高のチオール反応性を持たなかったことは驚きと予想外であった。言い換えれば、部分的表面接触性（表1、表2）は、チオール反応性と相關しなかった（表2）。実際には、20%から80%の中程度の表面接触性をも持つ部位（図4 A 、表1）、又は A 1 a または V a 1 残基のような部分的に露出した部位で改変された C y s 残基は、 S e r 残基で導入された C y s よりも良好なチオール反応性、すなわち > 0.6 を示し（図3 B 、表2）、従って、結晶構造情報だけではこれらの部位を選択するのに十分ではないので、チオール反応性部位のスクリーニングにおける P H E S E L E C T O R アッセイの使用を必要としている（図3 B 及び4 A ）。

40

【 0 1 6 3 】

50

チオール反応性データは、4 D 5 Th i o F a b システイン変異体のアミノ酸残基について、図3 A および図3 B に示される：(3 A) 非ビオチン標識化(コントロール)及び(3 B) ビオチン標識化ファージ Th i o F a b。抗体 / F a b の表面上の反応性チオール基は、非ビオチン標識化ファージ hu 4 D 5 F a b v 8 (3 A) 及びビオチン標識化ファージ hu 4 D 5 F a b v 8 (3 B) の B S A (オープンボックス)、H E R 2 (グレー ボックス) またはストレプトアビジン(ソリッドボックス)との相互作用について P H E S E L E C T O R アッセイ分析により同定された。アッセイは実施例2に記載の通りを行われた。軽鎖変異体は左側で、重鎖変異体は右側である。非ビオチン標識化 4 D 5 Th i o F a b システイン変異体の結合は予想通り低いが、H E R 2 への強い結合は保持されている。ビオチン標識化 4 D 5 Th i o F a b システイン変異体のストレプトアビジンおよびH E R 2 に対する結合の比率は表2にチオール反応性値を与える。450 nm でのバックグラウンドの吸光度、又は B S A に対するビオチン標識化 4 D 5 Th i o F a b システイン変異体の非特異的タンパク質結合の少量もまた図3 B において明らかである。C y s 残基に置き換えられた選択されたアミノ酸残基の部分的表面接触性の値は図4 A に示される。部分的表面接触性は、利用可能な hu 4 D 5 F a b v 7 の構造から計算して表1に示す (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。hu 4 D 5 F a b v 7 及び hu 4 D 5 F a b v 8 の構造の立体配座パラメータは非常に一貫性があり、hu 4 D 5 F a b v 7 の部分的表面接触性の計算と hu 4 D 5 F a b v 8 システイン変異体のチオール反応性との間の任意の相関関係の決定を可能にする。部分的に露出した残基 (A 1 a または V a l) で導入されたファージ Th i o F a b C y s 残基の測定されたチオール反応性は、S e r 残基で導入されたものに比べて優れたチオール反応性を持っている(表2)。表2の Th i o F a b C y s 変異体から、チオ反応性の値及び部分的表面接触性の間には、ほとんど、あるいは全く相関関係が無いことが見て取れる。

【0164】

抗体の位置、L-15、L-43、L-110、L-144、L-168、H-40、H-88、H-119、H-121、H-122、H-175、及びH-179のアミノ酸は一般に遊離システインアミノ酸で変異(置換)され得る。これらの位置の両側の約5アミノ酸残基内の範囲、すなわち、L-10からL-20；L-38からL-48；L-105からL-115；L-139からL-149；L-163からL-173；H-35からH-45；H-83からH-93；H-114からH-127；及びH-170からH-184、並びにH-268からH-291；H-319からH-344；H-370からH-380；及びH-395からH-405、から選択される F c 領域の範囲もまた遊離システイン酸で置き換えることができ、本発明のシステイン改変抗体を与える。

表2. ファージ-ThioFab のチオール反応性

ファージ-ThioFab コンストラクト	チオール反応性*	フラクショナル表面接触性(%) (表1から)
hu4D5Fabv8-wt	0.125	10
L-V15C	0.934	
L-A43C	0.385	
L-V110C	0.850	
L-A144C	0.373	
L-S168C	0.514	
H-A40C	0.450	
H-A88C	0.914	
H-S119C	0.680	
H-A121C	0.925	
H-S122C	0.720	20
H-A175C	0.19	
H-S179C	0.446	

L = 軽鎖, H = 重鎖, A = アラニン, S = セリン, V = バリン, C = システイン

* チオール反応性はストレプトアビジン結合の OD_{450 nm} 対 HER2(抗体)結合の OD_{450 nm} の比率として測定される(実施例2)。チオール反応性の値1とはシステインチオールの完全なビオチン標識化を示す。

【0165】

軽鎖 (L-V15C 及び L-V110C) 由来の 2 つの Cys 变異体、及び重鎖 (H-A88C 及び H-A121C) 由来の 2 つの Cys 变異体が、これらの变異体が最高のチオール反応性を示したため(表2)、更なる分析のために選ばれた。

【0166】

ファージの精製とは異なり、Fab の調製は生産規模に応じて、2 - 3 日必要になる場合がある。この間、チオール基の酸化のため、反応性を失う可能性がある。hu4D5Fabv8 - ファージ上のチオール基の安定性を調べるために、ファージ ThioFab のチオール反応性の安定性を測定した(図4B)。ThioFab ファージの精製後、1 日目、2 日目及び4日目に、全てのサンプルは、ビオチン-PEO-マレイミドを結合させ、及びHER2 及びストレプトアビジンの結合をテストするためにファージ E LISA アッセイ (PHESSELCTOR) で探索された。L-V15C、L-V110C、H-A88C 及び H-A121C は、他の ThioFab 变異体(図4B)と比較して、チオール反応性のかなりの量を保持している。

【0167】

システイン改変抗体を調製する方法

本発明の化合物は、親抗体の 1 つまたは複数のアミノ酸が遊離システインアミノ酸で置換されているシステインで改変された抗体を含む。システイン改変抗体は、1.0 ~ 0.6 の範囲にチオール反応性値を有する 1 つ以上の遊離システインアミノ酸を含む。遊離シ

10

20

30

40

50

ステインアミノ酸は、親抗体に改変されて、かつジスルフィド結合の一部ではないシステイン残基である。

【0168】

一態様では、システイン改変抗体は、

(a) システインによって親抗体の1つまたは複数のアミノ酸残基を置換し、及び
 (b) システイン改変抗体をチオール反応性試薬と反応させることにより、システイン改変抗体のチオール反応性を決定する
 ことを含む方法によって調製される。

【0169】

システイン改変抗体は、チオール反応性試薬に対して親抗体よりも反応性がある。

10

【0170】

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖又は軽鎖、または定数ドメイン又は可変ドメインに配置され得る。抗体断片、例えばF_{ab}は、また、抗体断片のアミノ酸を置換を1以上のシステインアミノ酸で改変されることができシステイン改変抗体断片を形成する。

【0171】

本発明の別の態様は、システイン改変抗体を調製(作製)する方法を提供し、

(a) システイン改変抗体を生成するために、親抗体に1つ以上のシステインのアミノ酸を導入し、及び

(b) チオール反応性試薬とシステイン改変抗体のチオール反応性を決定する
 ことを含み、

20

該システイン改変抗体は、チオール反応性試薬に対して親抗体よりも反応性である。

【0172】

システイン改変抗体を調製する方法の工程(a)は、

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発し、

(ii) システイン改変抗体を発現し、及び

(iii) システイン改変抗体を単離し精製する

ことを含み得る。

【0173】

システイン改変抗体を調製する本方法の工程(b)はファージ又はファージミド粒子から選択されるウイルス粒子にシステイン改変抗体を発現することを含み得る。

30

【0174】

システイン改変抗体を調製する本方法の工程(b)はまた、

(i) チオール反応性親和性試薬とシステイン改変抗体を反応させ、親和性標識された、
 システイン改変抗体を生成し、および

(ii) 親和性標識されたシステイン改変抗体のキャプチャメディアに対する結合を測定する

ことを含み得る。

【0175】

本発明の別の態様は、チオール反応性に関して、反応性の高い不対システインアミノ酸によるシステイン改変抗体のスクリーニングの方法であり、

40

(a) システイン改変抗体を生成するために、親抗体に1つ以上のシステインアミノ酸を導入し、

(b) システイン改変抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させ、親和性標識された、
 システイン改変抗体を生成し、及び

(c) 親和性標識されたシステイン改変抗体のキャプチャメディアに対する結合を測定し、及び

(d) チオール反応性試薬とのシステイン改変抗体のチオール反応性を決定する
 ことを含む。

【0176】

システイン改変抗体をスクリーニングする本方法の工程(a)は、

50

(i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を変異誘発し、
 (ii) システイン改変抗体を発現し、及び
 (iii) システイン改変抗体を単離して精製する
 を含む。

【0177】

システイン改変抗体をスクリーニングする本方法の工程 (b) は、ファージ又はファージミド粒子から選択されるウイルス粒子にシステイン改変抗体を発現することを含み得る。

【0178】

システイン改変抗体をスクリーニングする本方法の工程 (b) はまた、
 (i) システイン改変抗体をチオール反応性親和性試薬と反応させ、親和性標識された、
 システイン改変抗体を生成し、及び
 (ii) 親和性標識されたシステイン改変抗体のキャプチャメディアに対する結合を測定する

ことを含み得る。

【0179】

標識されたシステイン改変抗体

本発明のシステイン改変抗体は反応性システインチオール基を介して抗体に共有結合することができる任意の標識成分と結合させることができ(Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R. L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL)。付着した標識は：(i) 検出可能なシグナルを提供し、(ii) 第一または第二標識によって提供された検出可能なシグナルを修飾し、例えば(蛍光共鳴エネルギー転移)、FRETを与るために第二の標識と相互作用し、(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定化するか又は結合の親和性を増加させ、(iv) 電荷、疎水性、形状、又は他の物理的パラメータにより、移動度、例えば、例えば電気泳動移動度又は細胞透過性に影響を与え、又は(v) キャプチャ成分を提供し、リガンド親和性、抗体/抗原の結合、またはイオン性錯体形成を調節することに機能し得る。

【0180】

標識化システイン改変抗体は、例えば、特定の細胞、組織、又は血清中の目的の抗原の発現を検出するための、診断アッセイに有用であり得る。診断へ適用のために、抗体は、典型的には検出可能な成分で標識される。多数のラベルが利用可能であり一般的に次のカテゴリに分類することができる。

(a) 放射性同位元素(放射性核種)、例えば、³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹At又は²¹³Bi。

放射性同位元素標識抗体は、レセプター標的イメージング実験に有用である。抗体は、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)に記載の技術を用いて、抗体の改変されたシステインチオールと反応する、放射性同位元素の金属と結合し、キレートするかそうでなければ複合体を作るリガンド試薬で標識化可能である。金属イオンと複合体を作るキレート配位子はDOTA、DOPA、DOTP、DOTMA、DTPA及びTETA (Macrocycle clinics、ダラス、テキサス州)を含む。放射性核種は、本発明の抗体-ジルコニウムコンジュゲートとしてのシステイン改変抗体との複合体を介して標的にすることができる(Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146)。

【0181】

イメージング実験のための抗体標識として適した金属キレート錯体が開示されている：米国特許第5342606号；米国特許第5428155号；米国特許第5316757号；米国特許第5480990号；米国特許第5462725号；米国特許第54281

10

20

30

40

50

39号；米国特許第5385893号；米国特許第5739294号；米国特許第5750660号；米国特許第5834456号；Hnatowich et al (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares et al (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula et al (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera et al (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg et al (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee et al (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111; Miederer et al (2004) *J. Nucl. Medicine* 45:129-137; DeNardo et al (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend et al (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula et al (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi et al (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian et al (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli et al (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20. 10

【0182】

(b) 希土類のキレート(ユーロピウムキレート)等の蛍光標識、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセインを含むフルオレセインの型；TAMRAを含むローダミンの型；ダンシル；リサミン；シアニン；フィコエリトリン；テキサスレッド及びそのアナログ。蛍光標識は、例えば上掲のCurrent Protocols in Immunologyに開示される技術を使用して抗体に結合させることができる。蛍光色素及び蛍光標識試薬はInvitrogen社/Molecular Probes社(ユージーン、オレゴン州)及びピアースバイオテクノロジー社(ロックフォード、イリノイ州)から市販されているものが含まれている。 20

【0183】

(c) 様々な酵素-基質の標識が使用可能か又は開示されている(米国特許第4275149号)。酵素は、一般的に様々な技術を用いて測定することができる発色基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は基質の色の変化を触媒し得、それは分光光度計で測定することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変更することがある。蛍光の変化を定量化するための技術は上述されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、次いで(例えば、化学発光を使用して)測定可能な光を放出する場合があり、又は蛍光アクセプターにエネルギーを提供する。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、リンゴ酸デヒドログナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素)、複素環オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等が挙げられる。抗体に酵素を結合させるための技術が、O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Yunakis), Academic Press, New York, 73:147-166に説明されている。 30 40

【0184】

酵素-基質の組み合わせの例としては、例えば次のとおりである。

(i) 基質として過酸化水素を持つ西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ここで過酸化水素は色素前駆体(例えば、オルソフェニレンジアミン(OPD)又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジン塩酸塩(TMB))を酸化する；

(ii) 発色基質などのパラニトロフェニルリン酸(II)アルカリホスファターゼ(AP) 50

、及び

(i i i) 発色基質(例えば、p-ニトロフェニル- D-ガラクトシダーゼ(p-nitrophenyl- D-galactosidase))、又は蛍光基質4-メチルウンベリフェリル- D-ガラクトシダーゼ(4-methylumbelliferyl- D-galactosidase)を持つ D-ガラクトシダーゼ(D-Gal)。

【0185】

他の多くの酵素-基質の組み合わせが当業者に利用可能である。一般的なレビューについては、米国特許第4275149号、及び米国特許第4318980号を参照。

【0186】

標識は、システイン改変抗体と間接的に結合させることができる。例えば、抗体は、ビオチンを結合させることができ、上記のラベルの3つの広範なカテゴリのいずれかがアビジン又はストレプトアビジン(またはその逆)を結合させることができる。ビオチンは、ストレプトアビジンに選択的に結合し、従って、標識はこの間接的な方法で抗体と結合させることができる。あるいは、ポリペプチド変異体により標識の間接的な結合を達成するために、ポリペプチド変異体は、小さなハプテン(例えば、ジゴキシン)と結合し、及び、上記の標識の異なるタイプのうちの1つが、抗ハプテンペプチド変異体(例えば、抗ジゴキシン抗体)と結合する。従って、ポリペプチド変異体を示す標識の間接的な接合を達成することができる(Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego)。

【0187】

本発明のポリペプチド変異体は、ELISAのような公知のアッセイ法、競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイに用いることができる(Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。

【0188】

検出標識は、結合又は認識事象の局在化、可視化、及び定量化のために有用であり得る。本発明の標識抗体は、細胞表面レセプターを検出することができる。検出可能な標識抗体の別の使用は、蛍光標識抗体とビーズを結合し、リガンドの結合時に蛍光シグナルを検出することを含むビーズベースの免疫捕獲法である。同様の結合検出方法は、抗体-抗原の相互作用を測定し、検出する表面プラズモン共鳴(SPR)効果を利用する。

【0189】

蛍光色素及び化学発光色素などの検出標識(Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058)は、検出可能なシグナルを与え、好ましくは以下の特性を持つ抗体の標識に一般的に適用される。(i) 抗体の少量を無細胞及び細胞ベースのアッセイの両方で感度良く検出することができるよう、標識された抗体は、低いバックグラウンドで非常に高いシグナルを生成する必要がある。及び(i i) 標識された抗体は、蛍光シグナルが観察、モニタリングされ、及び著しい光退色なしで記録され得るよう、光安定である必要がある。膜又は細胞表面、特に生きた細胞への標識抗体の細胞表面結合を含む適用においては、標識は(i i i) 好ましくは効果的な複合体の濃度や検出感度を達成するために良好な水溶性を有し、かつ(i v) 正常な代謝過程を中断せず又は未成熟細胞の死を生じないように、生きた細胞に対して非毒性である。

【0190】

細胞の蛍光強度の直接的な定量及び蛍光標識されたイベントの列挙、例えば、ペプチド-色素複合体の細胞表面結合は、生きた細胞又はビーズによる、ミックス・アンド・リード、非放射性アッセイを自動化したシステム(FMATER8100 HTSシステム、アプライドバイオシステムズ、フォスター・シティ、カリフォルニア州)において行うことができる(Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)。

10

20

30

40

50

【0191】

標識抗体の使用はまた、細胞表面レセプター結合アッセイ、免疫捕獲アッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ(FLISA)、カスパーゼ切断(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; 米国特許第6372907号)、アポトーシス(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)、及び細胞毒性アッセイを含む。蛍光微量アッセイ技術は、細胞表面に標的化される分子による上方またはダ下方制御を同定するため使用することができる(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

10

【0192】

本発明の標識システイン改変抗体は、(i)MRI(磁気共鳴画像法)、(ii)MicroCT(コンピュータ断層撮影)、(iii)SPECT(単光子放出コンピュータ断層撮影)、(iv)PET(陽電子放出断層撮影)Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49、(v)生物発光、(vi)蛍光、及び(vii)超音波などの生物医学的および分子イメージングの様々な方法および技術によるイメージングバイオマーカー及びプローブとして有用である。免疫シンチグラフィーは、放射性物質で標識した抗体が、動物又はヒト患者に投与され、抗体の局在する体の部位で画像が取られるという撮像手順である(米国特許第6528624号)。イメージングバイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、又は治療的介入への薬理学的反応の指標として評価することができる。バイオマーカーは、いくつかの種類があり: 0型は、疾患の自然史のマーカーであり既知の臨床指標、例えば関節リウマチにおける滑膜炎のMRI評価との縦方向に相関し; I型マーカーはたとえ作用機構が臨床転帰と関連付けられることができなくても、作用機構に応じて介入の影響を捕獲し; II型マーカーは、サロゲートエンドポイントとして機能し、バイオマーカーの変化又はそのシグナルが、標的とされた応答、例えばCTにより測定された関節リウマチの骨の侵食を「検証」するための臨床的利点を予測する。イメージングバイオマーカーは、このように(i)標的タンパク質の発現、(ii)治療薬の標的タンパク質への結合、すなわち選択性、及び(iii)クリアランス及び半減期薬物動態データに関する薬力学的(PD)治療情報を提供することができる。実験室ベースのバイオマーカーに対するインビボのイメージングバイオマーカーの利点は、非侵襲的な治療、定量化可能な全身の評価、反復すなわち複数の時点での投与及び評価、及び前臨床的(小動物)結果から臨床的(ヒト)結果への移転可能な作用を含む。幾つかの適用では、バイオイメージングは、臨床試験における動物実験の数にとて変わること又はそれを最小限に抑えることとなる。

20

【0193】

放射性核種イメージング標識としては放射性核種、例えば、³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁸⁹Zr、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹At、又は²¹³Biを含む。放射性核種の金属イオンは、DOTAのようなキレート化リンカーと錯体を形成することができる。DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル)のようなリンカー試薬は、Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807)の手順に従って、アミノベンジルDOTAのクロロギ酸イソプロピルで活性化された4-マレイミド酪酸(Fluka)との反応により調製できる。DOTA-マレイミド試薬は、システイン改変抗体の遊離システインのアミノ酸と反応して抗体に金属錯化配位子を提供する(Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。DOTA-NHSなどのキレート化リンカー試薬((1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-4酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)は市販に入手可能である(Macrocyclics、ダラス、テキサス州)。放射性核種標識した抗体によるレセプタ

30

40

50

一標的イメージングは腫瘍組織中の抗体の進行性蓄積の検出及び定量により経路の活性化のマーカーを与える(Albert et al (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210)。結合した放射性金属は、細胞内の以下のリソソーム分解で残存し得る。

【0194】

ペプチド標識法はよく知られている。Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) *American Elsevier Publishing Co.*, New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, *CRC Press*, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., *Walter DeGryter*, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, *CRC Press*, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237を参照のこと。
10

【0195】

蛍光レポーター及びクエンチャーチーの2つの成分で十分近接して標識されたペプチドおよびタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を受ける。レポーター基は、通常、特定の波長の光によって励起される蛍光色素であり、最大輝度で発光するための適切なストークスシフトを有するアクセプター、またはクエンチャーチー基にエネルギーを転送する。蛍光色素は、フルオレセインおよびローダミンなど拡張された芳香族、及びそれらの誘導体を持つ分子を含む。蛍光レポーターは部分的または著しくインタクトなペプチド中のクエンチャーチー成分によってクエンチされることがある。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断時には、検出可能な蛍光の増加を測定することができる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34)。
20

【0196】

本発明の標識抗体はまた、アフィニティー精製薬剤として使用され得る。このプロセスでは、標識抗体は、当技術分野で周知の方法を用いて、セファデックス樹脂や濾紙等の固相に固定される。固定化抗体は、精製されるべき抗原を含む試料と接触させられ、その後支持体は、固定化されたポリペプチド変異体に結合した精製されるべき抗原を除いて、試料中の実質的にすべての材料を除去する適当な溶剤で洗浄される。最後に、支持体は、例えば、グリシン緩衝液、pH 5.0など、別の適当な溶剤で洗浄され、ポリペプチド変異体から抗原を解放する。
30

【0197】

標識化試薬は典型的には反応的な官能性を有し、(i)システィン変換抗体のシスティンオールと直接反応し、標識化抗体を形成し、(ii)リンカーリ試薬によりリンカーリー標識中間体を形成し、又は(iii)リンカーリ抗体により標識化抗体を形成し得る。標識試薬の反応性官能基は、次のとおりである：マレイミド(maleimide)、ハロアセチル(haloacetyl)、ヨードスクシンイミジルエステル(iodoacetamide succinimidyl ester)（例えばNHS、N-ヒドロキシスクシンイミド(hydroxysuccinimide)）、イソチオシアネート(isothiocyanate)、スルホニルクロリド(sulfonyl chloride)、2,6-ジクロロトリアジニル(dichlorotriazinyl)、ペンタフルオロフェニルエステル(pentafluorophenyl ester)、ホスホルアミダイトphosphoramidite、しかし他の官能基を使用することもできる。
40

【0198】

典型的な反応性官能基は、検出可能な標識のカルボキシル基の置換基のN-ヒドロキシ

50

スクシンイミジルエステル (NHS)、例えば、ビオチン又は蛍光染料である。標識の NHS エステルは、予め形成され、単離され、精製され、及び / 又は特性を明らかにされ、またはその場で形成され、抗体の求核基と反応させられる可能性がある。典型的に、標識のカルボキシル基の形態は、カルボジイミド試薬、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide)、ジイソプロピルカルボジイミド (diisopropylcarbodiimide)、又はウロニウム試薬、例えば T S T U (O-(N-サクシニミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート ((O-(N-Succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate))、H B T U (O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロスファート ((O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate) 又は H A T U (O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロスファート ((O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate))、活性化因子、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、及び N-ヒドロキシサクシニミド (N-hydroxysuccinimide) との所定の組み合わせによる反応によって活性化され、標識の NHS エステルを与える。いくつかの事例では、標識及び抗体は、インサイツで標識が活性化され抗体と反応して結合し得て、一段階で標識抗体複合体を形成し得る。他の活性化試薬及びカップリング試薬としては、T B T U (2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1-1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロスフェート) ((2-(1H-benzotriazo-1-yl)-1-1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate))、T F F H (N,N',N",N'')-テトラメチルウロニウム 2-フルオロ-ヘキサフルオロfosfate ((N,N',N",N'')-tetramethyluronium 2-fluoro-hexafluorophosphate)、P y B O P (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリビロリジノホスホニウムヘキサフルオロfosfate (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate)、E E D Q (2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン) (2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydro-quinoline)、D C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド) (dicyclohexylcarbodiimide)；D I P C D I (ジイソプロピルカルボジイミド) (diisopropylcarbodiimide)、M S N T (1-メシチレン-2-スルフォニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-triazole)、及びアリールスルホニルハロゲン化物、例えば、トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド (triisopropylbenzenesulfonyl chloride) を含む。

【0199】

T H I O F A B S に対するビオチン - マレイミドの結合

ファージコートタンパク質への Fab の融合は、潜在的にシステインチオールの接触性又は反応性を変える可能性があるため、上述した ThioFab の特性は、ファージの存在下で定められた。したがって、ThioFab のコンストラクトは、アルカリホスファターゼプロモーター下で発現ベクターにクローニングされ (Chang et al (1987) Gene 55: 189-196)、ThioFab の発現はリン酸塩を含まない培地で生育する大腸菌細胞により誘導された。ThioFab は、プロテイン G S E P H A R O S E TM カラムで精製され、還元及び非還元 SDS-PAGE ゲル上で分析された。これらの分析は、ThioFab は、それらの反応性チオール基を保持するか、又は分子内または分子間のジスルフィド結合を形成することにより不活性にされたかどうかの評価を可能にする。ThioFab の L-V15C、L-V110C、H-A88C、及び H-A121C は発現され、プロテイン - G S E P H A R O S E TM カラムクロマトグラフィーにより精製された（詳細については方法についての項を参照）。精製したタンパク質は、(DTT による) 還元条件、及び (DTT 無しの) 非還元条件において SDS-PAGE ゲル上で分析された。他の還元剤、例えば BME (-メルカプトエタノール) は、鎖間のジスルフィド基を切断するゲルで使用できる。ThioFab の主要な (~90%) 分画は、単量体にあり、一方野生型 hu4D5Fabv8 は、本質的に単量体 (47 kDa) にあることが SDS-PAGE ゲル分析から明らかである。

10

20

30

40

50

【0200】

ThioF ab (A 1 2 1 C) 及び野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 はビオチン-マレイミドの 100 倍過剰で室温で 3 時間インキュベートされ、ビオチン化 F a b が Superde x - 2 0 0 TM ゲルろ過カラムにロードされた。この精製工程は、オリゴマーの F a b から、及びまた過剰な遊離ビオチン-マレイミド（又はフリージルコニウム試薬）から単量体の F a b を分離するのに有用であった。

【0201】

図 5 はファージコンテキストの非在下での ThioF ab 変異体の特性の検証を示す。ファージ融合の無いタンパク質、h u 4 D 5 F a b v 8 及び h u 4 D 5 F a b v 8 - A 1 2 1 C (ThioF ab - A 1 2 1 C) が発現され、プロテイン-G アガロースビーズを用いて精製された後、ビオチン-マレイミドの 100 倍モル過剰と共にインキュベートした。ビオチン化システイン改変 ThioF ab 及び非ビオチン化野生型 F a b のストレプトアビジン及び H E R 2 との結合を比較した。ビオチン結合（ストレプトアビジンとの相互作用）の程度及び H E R 2 への結合能は、E L I S A 分析によりモニタリングされた。各 F a b は 2 n g 及び 20 n g で試験された。

【0202】

ビオチン化 A 1 2 1 C ThioF ab は、野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 のそれに匹敵する H E R 2 結合を保持した（図 5）。野生型 F a b 及び A 1 2 1 C - ThioF ab は、ゲル滌過カラムクロマトグラフィーにより精製された。二つの試料は、二次抗体としてヤギ抗 F a b - H R P を用いる E L I S A 法で、H E R 2 及びストレプトアビジンの結合が試験された。野生型（オープンボックス）及び ThioF ab（点線のボックス）の両方は、H E R 2 に同様に結合するが、ThioF ab のみ、ストレプトアビジンが結合を保持していた。ストレプトアビジンとの相互作用のバックグラウンドレベルのみ、非ビオチン化野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 で観察された（図 5）。ビオチン化 ThioF ab (A 1 2 1 C) の質量スペクトル (L C - E S I - M S) 分析では、野生型 h u 4 D 5 F a b v 8 (4 7 7 3 7 ダルトン) に比べて 4 8 2 9 4.5 ダルトンの主要ピークをもたらした。2 つの分子間の 5 3 7.5 ダルトンの差は ThioF ab へ結合した単一のビオチン-マレイミドに正確に対応している。質量分析タンパク質シーケンシング (L C - E S I - タンデム質量分析解析) は、結合したビオチン分子は新たに改変された C y s 残基においてであったことを更に確認した（表 4、実施例 3）。

【0203】

アルブミン結合ペプチド (A B P) - T H I O F A B に対するビオチン-マレイミドの部位特異的結合

血漿タンパク質の結合は、短寿命の分子の薬物動態学的特性を向上させる有効な手段とすることができる。アルブミンは、血漿中で最も豊富な蛋白質である。血清アルブミン結合ペプチド (A B P) は、組織取り込み、浸透、及び拡散の変化を含む、融合した活性ドメインタンパク質の薬物動態を変えることができる。これらの薬物動態パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列の特定の選択によって調節することができる（米国特許出願公開第 2 0 0 4 0 0 0 1 8 2 7 号）。アルブミン結合ペプチドの系列がファージディスプレイスクリーニングによって同定された (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; 国際公開第 01 / 4 5 7 4 6 号)。本発明の化合物は、(i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 の表 III 及び IV, 頁 35038; (ii) 米国特許出願公開第 20040001827 号の [0076]、配列番号 9-22; 及び (iii) 国際公開第 01/45746 号の 頁 12-13、配列番号 z1-z14 に教示された ABP 配列を含み、その全てが参照により本明細書に援用される。

【0204】

アルブミン結合 (A B P) - F a b は、1 : 1 の化学量論比 (1 A B P / 1 F A B) での F a b 重鎖の C 末端に対するアルブミン結合ペプチドの融合により改変された。これらの A B P - F a b とアルブミンとの会合は、ウサギ及びマウスにおいて 25 倍以上にそれ

10

20

30

40

50

らの半減期を増加させることができた。上記の反応性 Cys 残基は、したがって、これらの ABP-Fab に導入され、ジルコニウム試薬との部位特異的結合に使用することができ、インビオでの動物実験が続く。

【0205】

典型的なアルブミン結合ペプチド配列は、限定されないが、配列番号 1 - 5 に記載されているアミノ酸配列を含む。

CDKHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	配列番号1
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	配列番号2
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	配列番号3
RLIEDICLPRWGCLWEDD	配列番号4
DICLPRWGCLW	配列番号5

【0206】

アルブミン結合ペプチド (ABP) の配列は K_d (ウサギ) = $0.3 \mu M$ で複数の種 (マウス、ラット、ウサギ、ウシ、アカゲザル、ヒヒ、ヒト) 由来のアルブミンに結合する。アルブミン結合ペプチドは、アルブミン結合することが知られているリガンドとは競合せず、かつ 2 - 3 時間のウサギの半減期 ($T_{1/2}$) を持つ。ABP-Thiophab タンパク質は BSA-EPHAROSETM 上で精製され、その後前の節で説明した通りに、ビオチン-マレイミドが結合され、スーパーデックス-5200 カラムクロマトグラフィー上で精製された。精製されたビオチン化タンパク質は均質であって、任意のオリゴマーの形態を欠いていた (実施例 4)。

【0207】

図 6 は、アルブミン結合ペプチド (ABP) Thiophab 変異体の特性を示す。ELISA 分析は、ウサギアルブミン、ストレプトアビシン及び HER2 と、ABP-hu4D5Fab_{v8}-WT、ABP-hu4D5Fab_{v8}-V110C 及び ABP-hu4D5Fab_{v8}-A121C との結合能を試験するために実施した。ビオチン化 ABP-Thiophab は、ELISA (図 6) 及び BIAcore の結合動力学解析 (表 3) で確認されたように、野生型 ABP-hu4D5Fab_{v8} のそれに似た親和性でアルブミン及び HER2 に対して結合することができる。ELISA プレートは、前述のように、アルブミン、HER2 及び SA で被覆された。アルブミン、HER2 及び SA へのビオチン化 ABP-Thiophab の結合は抗 Fab HRP で探索された。ビオチン化 ABP-Thiophab は、非ビオチン化のコントロールである ABP-hu4D5Fab_{v8}-WT と比較して、ストレプトアビシンに結合することができ、同じシステイン変異体が両方の変異体に使用されたため、ABP-Thiophab は部位特異的な方法で Thiophab のようなビオチンマレイミドと結合したことを示している (図 6)。

【0208】

10

20

30

30

40

表 3. ビオチン標識化 ABP-hu4D5Fabv8 野生型及び ThioFab への HER2 及び
ウサギアルブミンの結合のためのビアコア動態解析

抗体	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_d (nM)
HER2 の結合			
野生型	4.57×10^5	4.19×10^{-5}	0.0917
V110C	4.18×10^5	4.05×10^{-5}	0.097
A121C	3.91×10^5	4.15×10^{-5}	0.106
ウサギアルブミンの結合			
野生型	1.66×10^5	0.0206	124
V110C	2.43×10^5	0.0331	136
A121C	1.70×10^5	0.0238	140

ABP = アルブミン結合ペプチド

【0209】

あるいは、アルブミン結合ペプチドは、リンカー成分を介して共有結合によって抗体に結合することができる。

【0210】

FABあたり2つの遊離のチオール基を持つ ABPチオFabの改変 (engineering)

上記の結果は、4つの全ての (L-V15C、L-V110C、H-A88C及びH-A121C) ThioFab (システイン改変Fab抗体) 変異体は、標識化試薬、リンカー試薬、又はジルコニウム-リンカー中間体による部位特異的結合に使用することができる反応性チオール基を持っていることを示している。L-V15Cを発現させて、比較的低い収率で精製することができる。しかし、L-V110C、H-A88C及びH-A121C変異体の発現及び精製収量は hu4D5Fabv8のそれに類似していた。したがって、これらの変異体は、さらなる分析のために使用され、Fabごとに複数のチオール基を得るために再結合することができる。この目的に向けて、軽鎖の1つのチオール基及び重鎖の一つのチオール基が、Fab分子あたり2個のチオール基を獲得するために構築された (L-V110C / H-A88C及びL-V110C / H-A121C)。これら2つの二重Cys変異体は大腸菌発現系で発現され、精製された。精製されたビオチン化ABP-ThioFabの均質性は、単一のCys変異体のそれに類似であることが判明した。

【0211】

Fabあたり二つの反応性のCys残基へ改変することの影響が調べられた (図7)。第二のビオチンの存在が、ストレプトアビシン-HRPを使用して、ビオチン化ABP-ThioFabのSAに対する結合を探索することによって試験した (図7)。SA / Fabの分析のために、ELISAプレートは、SAで被覆され、抗Fab-HRPで探索された。SA / SAの分析のために、ELISAプレートはSAで被覆され、SA-HRPで探索された。図7。HER2、ストレプトアビシン (SA)、HER2 / Fab、SA / Fab及びSA / SAによるビオチン化ABP-hu4D5Fabv8システイン変異体の相互作用に関するELISA分析は、それらの相互作用は、抗Fab-HRP、SA-HRPのそれれによってモニタリングされたことを示している。SA / Fabは、Fabごとに单一のビオチンの存在をモニタリングし、Fabごとに複数のビオチンが、SA / SA分析によってモニタリングされている。二重システイン変異体とのHER2の結合は、単一Cys変異体のそれに似ている (図7)。しかし、二重Cys変異体におけるビオチン化の程度は、単一のCys変異体に比べてFab分子当たり1つ以上の遊離のチオール基に起因し高かった (図7)。

【0212】

トラスツズマブのチオIgG抗体変異体の改変 (engineering)

システインが、完全長のモノクローナル抗体であるトラスツズマブ (ハーセプチニ (登

10

20

30

40

50

録商標)、ジェネンテック社)に、特定の残基にて導入された。トラスツズマブの单一システイン変異体H-A88C、H-A121C及びL-V110C、及びトラスツズマブのV110C-A121C及びV110C-A121C二重システイン変異体は1mMシステムを含有する培地中で一過性発酵によりCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞で発現させた。A88C変異重鎖配列(450アミノ酸)配列番号6である。A121C変異重鎖配列(450アミノ酸)は配列番号7である。V110C変異軽鎖配列(214アミノ酸)は配列番号8である。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRCEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTIVTVSS 10
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIATEGESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号6

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTIVTVSS
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIATEGESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDKSRW 30
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTCAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号8

40

【0213】

一実施態様によれば、システイン改変チオ-トラスツズマブ抗体は、遊離システインアミノ酸を持つ以下の可変領域重鎖配列の一つ以上を含んでいる(配列番号9-16)。

変異体	配列	配列番号
A40C	WVRQCPGKGL	配列番号9
A88C	NSLRCEDTAV	配列番号10
S119C	LTVVCSASTKGPS	配列番号11
S120C	LTVVSCASTKGPS	配列番号12
A121C	LTVSSCSTKGPS	配列番号13
S122C	LTVSSACTKGPS	配列番号14
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	配列番号15
S179C	HTFPALQCSGLYS	配列番号16

10

【0214】

一実施態様によれば、システイン改変チオ-トラスツズマブ抗体は、遊離システインアミノ酸を持つ以下の可変領域軽鎖配列の一つ以上を含んでいる（配列番号17-27）。

変異体	配列	配列番号
V15C	SLSASCGDRVT	配列番号17
A43C	QKPGKCPKLLI	配列番号18
V110C	EIKRTCAAPS	配列番号19
S114C	TCAAPCVFIFPP	配列番号20
S121C	FIFPPCDEQLK	配列番号21
S127C	DEQLKCGTASV	配列番号22
A144C	FYPRECKVQWK	配列番号23
A153C	WKVDNCLQSGN	配列番号24
N158C	ALQSGCSQESV	配列番号25
S168C	VTEQDCKDSTY	配列番号26
V205C	GLSSPCTKSFN	配列番号27

20

【0215】

得られた完全長のチオトラスツズマブIgG変異体は、チオール反応性及びHER2結合活性について測定された。図13Aは、固定されたHER2及び吸光度検出用HRP標識二次抗体に結合するビオチン化抗体の模式図を示す。図13Bは、450nmでの吸光度検出による固定化HER2への結合の測定値を示し、（左から右へ）非ビオチン化野生型トラスツズマブ（Wt）、ビオチン-マレイミド結合チオ-トラスツズマブ変異体V110C（単一Cys）、A121C（単一Cys）、及びV110C-A121C（2重Cys）。各チオIgG変異体及びトラスツズマブは1ng、10ng、及び100ngで試験された。測定は、ビオチン化抗HER2 ThioMabはHER2結合活性を保持していることを示している。

30

【0216】

図14Aは、吸光度検出のために抗IgG-HRPへのビオチンの結合した固定化HER2に結合するビオチン化抗体の模式図を示している。図14Bは、ビオチン-マレイミド結合チオトラスツズマブ変異体及びストレプトアビシンに結合している非ビオチン化野生型トラスツズマブの450nmでの吸光度の検出による結合測定値を示している。左から右へ：V110C（単一Cys）、A121C（単一Cys）、V110C/A121C（二重Cys）、及びトラスツズマブ。各チオIgGトラスツズマブ変異体及び親のトラスツズマブは、1ng、10ng、及び100ngで試験された。測定結果は、HER2 ThioMabが高いチオール反応性を有することを示している。

40

【0217】

システインは、完全長の2H9抗EphB2R抗体に所定の残基で導入された。2H9の单一システイン変異体H-A121Cを1mMシステインを含有する培地中で一過性発

50

酵により C H O (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞で発現させた。 A 1 2 1 C 2 H 9 变異体重鎖配列 (450 アミノ酸) は配列番号 28 である。

【 0 2 1 8 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFINPSTGYTDY
 NQKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRPKIPRHANVFWGQGTLTVSS
 CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 10
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号28

【 0 2 1 9 】

システィン改変チオ-2H9抗体は、遊離システィンアミノ酸を持つ次のFc定常領域の重鎖配列を含む（配列番号29-38）。

変異体	配列	配列番号
V273C	HEDPECKFNWYVDGVEVHNAKTKP	配列番号29
V279C	HEDPEVKFNWYCDGVEVHNAKTKP	配列番号30
V282C	HEDPEVKFNWYVDGCEVHNAKTKP	配列番号31
V284C	HEDPEVKFNWYVDGVECHNAKTKP	配列番号32
A287C	HEDPEVKFNWYVDGVEVNCKTKP	配列番号33
S324C	YKCKVCNKALP	配列番号34
S337C	IEKTICKAKGQPR	配列番号35
A339C	IEKTISKCKGQPR	配列番号36
S375C	KGFYPCDIAVE	配列番号37
S400C	PPVLDGDSFF	配列番号38

10

20

30

【 0 2 2 0 】

図16は、固定化プロテインA上で精製後の2H9 ThioMabのFc変異体の非還元（上）及び還元（下）変性SDS-PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）解析を示す（左から右、レーン1-9）A339C；S337C；S324C；A287C；V284C；V282C；V279C；V273C、及び2H9野生型。右側のレーンは、サイズマーカーラダーであり、インタクトなタンパク質が約150kDaであり、重鎖断片が約50kDa、及び軽鎖断片が約25kDaであることを示している。図17Aは、固定化プロテインA上で精製後の2H9 ThioMab変異体の非還元（左）及び還元（右）変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析を示す（左から右、レーン1-4）：L-V15C；S179C；S375C；S400C。図17Bは固定化プロテインA上で精製後の更なる2H9及び3A5 ThioMab変異体の非還元（左）及び還元（右）変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析を示す。（Fab並びにFc領域における）2H9 ThioMab変異体が記載された通りに発現され精製された。図16、図17A及び図17Bに見られるように、全てのタンパク質はSDS-PAGE上で均質であり、その後実施例11の還元及び酸化の手順を経て、結合のための反応性ThioMabを調製した（実施例12）。

40

【 0 2 2 1 】

システィンは、完全長の3A5抗MUC16抗体に所定の残基で導入された。3A5の

50

単一システイン変異体 H - A 1 2 1 C を 1 mM システインを含有する培地中で一過性発酵により C H O (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞で発現させた。 A 1 2 1 C 3 A 5 変異重鎖配列 (4 4 6 アミノ酸) は配列番号 3 9 を含む。

DVQLQESGPGLVNPSQLSLTCTVTGYSITNDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYINYSGYTTY
 NPSLKSRSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGTLVTSACSTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVF 10
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号39

20

【 0 2 2 2 】

システイン改変チオ - 3 A 5 抗 M U C 1 6 抗体は、遊離システインアミノ酸を持つ次の可変領域重鎖配列を含む (配列番号 4 0 - 4 4) 。

変異体	配列	配列番号
F45C	NWIRQCPGNK	配列番号40
A90C	LNSCTTEDTAT	配列番号41
A121C	GQGTLVTVSACSTKGPSVFPL	配列番号42
A175C	HTFPCVLQSSGLYS	配列番号43
V176C	HTFPACLQSSGLYS	配列番号44

30

【 0 2 2 3 】

システイン改変チオ - 3 A 5 抗 M U C 1 6 抗体は、遊離システインアミノ酸を持つ次の可変領域軽鎖配列を含む (配列番号 4 5 - 4 9) 。

変異体	配列	配列番号
L15C	FLSVSCGGRVT	配列番号45
A43C	QKPGNCPRLLI	配列番号46
V110C	EIKRTCAAPSV	配列番号47
A144C	FYPRECKVQWK	配列番号48
S168C	VTEQDCKDSTY	配列番号49

40

【 0 2 2 4 】

T H I O M A B のチオール反応性

完全長 I g G システイン改変抗体 (T h i o M a b) のチオール反応性は、ビオチン標識及びストレプトアビジンの結合によって測定した。ウェスタンプロットアッセイは、ビオチン - マレイミドと特異的に結合される T h i o M a b をスクリーニングするためにセットされた。このアッセイにおいて、抗体は還元 S D S - P A G E 上で分析され、ビオチンの存在は、ストレプトアビジン - H R P と共にインキュベートすることによって特異的に探索される。図 1 8 から分かるように、ストレプトアビジン - H R P の相互作用は、ど

50

ちらの改変されたシステイン変異体が使用されているに応じて、重鎖又は軽鎖で観察されており、ThioMab変異体は、改変されたCys残基で特異的にビオチンを結合させたことを示している。図18は、固定化した抗IgG-HRP（上のゲル）及びストレプトアビジン-HRP（下のゲル）上で捕獲した後の、還元され、ビオチン標識化されたチオ-IgG変異体の変性ゲル分析を示している。レーン1：3A5 H-A121C。レーン2：3A5 L-V110C。レーン3：2H9 H-A121C。レーン4：2H9 L-V110C。レーン5：抗EphB2R2H9親、野生型。各変異体（レーン1-4）はHRP検出を持つ抗IgGによって捕獲され（上）、感受性及び親和性が保持されていることを示している。HRP検出を持つ固定化ストレプトアビジンによる捕獲で、重鎖及び軽鎖上でビオチンの位置を確認した。レーン1及び3のシステイン改変抗体のシステイン変異の場所は重鎖である。レーン2及び4のシステイン改変抗体のシステイン変異の場所は軽鎖である。システイン変異部位は、ビオチン-マレイミド試薬との結合を受ける。

【0225】

図18のThioMabシステム改変抗体、及びLC/MSによる2H9 V15C変異体の分析により、チオール反応性の定量的指標を得た（表5）。

表5 ThioMabのビオチン標識-チオール反応性のLC/MS定量化

ThioMab 変異体	ThioMabあたりのビオチンの数
2H9 野生型	0.0
2H9 L-V15C	0.6
2H9 L-V110C	0.5
2H9 H-A121C	2.0
3A5 L-V110C	1.0
3A5 H-A121C	2.0

【0226】

システイン・エンジニアリングは、IgG抗体の定常ドメイン、すなわち、Fc領域で行われた。様々なアミノ酸部位がシステイン部位に変換されて、変異体、すなわちシステイン改変抗体が発現され、それらのチオール反応性が評価された。ビオチン標識化2H9

ThioMabのFc変異体は、ELISAアッセイで固定化ストレプトアビジン上の捕獲によるHRPの定量により、チオール反応性が評価された（図19）。ELISAアッセイは、反応性チオール基を持つCys残基を迅速にスクリーニングするために確立された。図19の模式図に示すように、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用は、抗IgG-HRPによる探索と続く450nmでの吸光度の測定によってモニタリングされる。これらの結果は、2H9-Fc変異体のV282C、A287C、A339C、S375C及びS400Cは中程度から最高度のチオール反応性有することを確認する。2H9 ThioMabのFc変異体のビオチン結合の程度は、表6に報告されているように、LS/MS分析により定量された。LS/MS分析は、A282C、S375C及びS400C変異体は100%ビオチンと結合し、かつV284C及びA339Cは50%結合していることが確認され、反応性システインチオール基の存在を示している。他のチオFc変異体、及び親の野生型2H9は、ほとんどビオチン化されないかまたは全くビオチン化されないかのいずれかであった。

10

20

30

40

表 6 2H9 Fc ThioMab のビオチン標識の LC/MS 定量化

2H9 ThioMab Fc 変異体	% ビオチン化
V273C	0
V279C	31
V282C	100
V284C	50
A287C	0
S324C	71
S337C	0
A339C	54
S375C	100
S400C	100
(野生型 2H9)	0

10

【 0 2 2 7 】

チオ-4D5 FAB 軽鎖変異体のチオール反応性

抗 E r b B 2 抗体 4 D 5 の様々なシステイン改変軽鎖変異体 F a b のスクリーニングは、図 8 の P H E S E L E C T O R アッセイで測定されるように、チオール反応性が 0 . 6 及びそれ以上の値である数多くの変異体を与えた（表 7）。表 7 のチオール反応性値は、H C - A 1 2 1 C 変異体の完全なビオチン化を想定して 1 0 0 % に設定される重鎖 4 D 5 T h i o F a b 変異体（H C - A 1 2 1 C ）に対して正規化され、パーセント値に従って表される。

20

【 0 2 2 8 】

表 7 4D5 ThioFab 軽鎖変異体のチオール反応性のパーセント値

4D5 ThioFab 変異体	チオール反応性の値(%)
V15C	100
V110C	95
S114C	78
S121C	75
S127C	75
A153C	82
N158C	77
V205C	78
(H C - A 1 2 1 C)	100
(4D5 野生型)	25

30

40

【 0 2 2 9 】

50

ジルコニウム標識化試薬

デスフェリオキサミンB (Df)に基づく典型的な二官能性試薬はモノクローナル抗体 (mAb)を含む抗体に対する⁸⁹Zrの錯体形成に用いられる。デスフェリオキサミンB (N'-{5-[アセチル(ヒドロキシ)アミノ]ペンチル}-N-[5-({4-[5-アミノペンチル](ヒドロキシ)アミノ]-4-オキソブタノイル}アミノ)ペンチル]-N-ヒドロキシスクシンイミド (N'-{5-[acetyl(hydroxy)amino]penty1}-N-[5-({4-[5-aminopenty1](hydroxy)amino]-4-oxobutanoyl}amino)pentyl]-N-hydroxysuccinamide) (CAS登録番号70-51-9)；及びデフェロキサミンとしても知られるデフェロキサミンB、DFO-B、DFOA、DFB又はデスフェラールは、放線菌類ストレプトマイセスピロースス (Streptomyces pilosus)によって生成された細菌のシデロフォアである(図20上)。デスフェリオキサミンBは、体から過剰な鉄を除去するために使用されるキレート剤としての医療用途がある (Miller, Marvin J. "Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs" (1989) Chemical Reviews 89 (7):1563-1579)。DFO-Bのメシル酸塩は市販されている。最初の実験は、N-(S-アセチル)チオアセチル-Df (SATADf)、及びリジン側鎖のアミノ基に結合したマレイミド基、4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボン酸塩 (4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) で装飾されたmAb (mAb-SMCC)で行われた(Meijs WE et al. "Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice" (1997) J. Nucl. Med. 38:112-8; Meijs WE et al. "A facile method for the labeling of proteins with zirconium isotopes" (1996) Nucl Med Biol. 23:439-48)。しかしながら、得られたチオエーテル結合体 (MAB-SMCC-SATA-Df)は、37⁹でヒト血清中では不安定であった(Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med 44:1271-81)。別の例示的なアミノ反応性二官能性キレート剤が、無水コハク酸 (Suc) で修飾されたDfに基づいて、Dfのアミノ基をカルボン酸に変換するために使用され、続いて2,3,5,6-テトラフルオロエステル (TFP) として活性化された。TFP-N-Suc-Df (図20中央)をmAbのリジン-アミノ基に結合させ、精製されたmAb-N-Suc-Dfは⁸⁹Zrでキレートされた。得られた⁸⁹Zr-mAb-N-Suc-Dfは生理的条件下で安定であり、マウスにおいてその生体内分布が比較された(Verel I et al. "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med. 44:1271-81)。しかし、TFP-N-Suc-Dfの調製は、Fe (III)錯体としてヒドロキシアミド基の保護を必要とする。鉄は⁸⁹Zrとキレート化する前に、EDTA処理により除去されるが、多段階法は、面倒であり、デスフェリオキサミンから鉄の除去が不完全である危険性を有し、及び/又は複合体バッファからのEDTAの不完全な除去は、⁸⁹Zrキレートの収率にマイナスの影響を与える可能性がある。したがって、ヘテロ二官能性アミノ反応性試薬、p-イソチオシアナトベンジルデスフェリオキサミン (Df-Bz-NCS) (p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine) が、チオ尿素結合を介してDfをタンパク質に導入するために近年開発された；図20中央(Perk LR et al. "Facile radiolabeling of monoclonal antibodies and other proteins with zirconium-89 or gallium-68 for PET Imaging using p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine" (2008) Nature Protocols, published online:DOI:10.1038/nprot.2008.22; Perk LR et al. "p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging" (2009) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging)。Df-Bz-NCSを用いて調製された抗体複合体はTFP-N-Suc-Dfを用いて調製された参照となる抗体複合体に匹敵する安定性及びイメージング特性を示した。リジン-アミノ基を介して抗体と⁸⁹Zrを結合させる信頼性の高い方法が開発されたため、報告される⁸⁹Zr標識抗体の前臨床的および臨床的immunoPET研究の数は急速に増加している(Verel I, et al. "Long-lived positron emitters zirconium-89 and iodine-124 for scouting" 50

of therapeutic radioimmunoconjugates with PET" (2003) *Cancer Biother Radiopharm* 18:655-61; Nagengast WB et al. "In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft" (2007) *J Nucl Med.* 48:1313-9; Perk LR, et al. "(89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab" (2005) *J Nucl Med.* 46:1898-906; Perk LR et al. "Quantitative PET imaging of Met-expressing human cancer xenografts with (89)Zr-labelled monoclonal antibody DN30" (2008) *European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging* 35:1857-67; Perk LR et al. "Preparation and evaluation of (89)Zr-Zevalin for monitoring of (90)Y-Zevalin biodistribution with positron emission tomography" (2006) *European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging* 33:1337-45; Borjesson PK et al. "Performance of immunopositron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients" (2006) *Clin Cancer Res.* 12:2133-40; Aerts HJ et al. "Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET" (2009) *J Nucl Med.* 50:123-31; Dijkers EC et al. "Development and Characterization of Clinical-Grade 89Zr-Trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET Imaging" (2009) *J Nucl Med.* 50(6):974-981).

【0230】

10

ジルコニウム錯体の実施態様はまた、ジルコニウム結合（キレート）配位子、例えば、DTPA (CASカタログ番号 67-43-6)、DOPA (1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸) (Liu, Shuang (2008) *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(12): 1347-1370), cyclopentadienyl, and allyl groups (Erker, G. (1991) *Pure and Applied Chemistry* 63(6):797-806; Erker, G. (1990) *Jour. of Organometallic Chem.* 400(1-2):185-203)を含み、その各々は本明細書に参照により援用される。

【0231】

20

ジルコニウム錯体 (Z) 及び他の放射性核種は、リジン側鎖の -アミノ基、又はシステインのチオール基を介して、モノクローナル抗体 (mAbs) を含む抗体 (Ab) に対して結合させることができる。およそ 40 のリジン側鎖 (Wang L et al. "Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry" (2005) *Protein Sci.* 14:2436-46) 又は 8 つのシステイン (Hamblett KJ et al. "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate" (2004) *Clin Cancer Res.* 10:7063-70) がモノクローナル抗体において結合に利用できるため、両方の方法が mAb 複合体比率及び結合部位に関して不均一性を与えている。結合部位内のリジン残基の修飾は複合体の生物学的活性を減容させる可能性があるが (Cai W et al. "PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an 18F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody" (2007) *J Nucl Med.* 48:304-10; Shively JE. "18F labeling for immuno-PET: where speed and contrast meet" (2007) *J Nucl Med.* 48:170-2; Tait JF et al. "Improved detection of cell death in vivo with annexin V radiolabeled by site-specific methods" (2006) *J Nucl Med.* 47:1546-53; Schellenberger EA et al. "Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy" (2003) *Neoplasia (New York, N.Y.)* 5:187-92)、ヒンジ領域におけるシステインの修飾は血漿半減期の低下を与える (Hamblett KJ et al. "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate" (2004) *Clin Cancer Res.* 10:7063-70)。これらの限界は、システインへの変異のために抗体の好ましいアミノ酸の迅速な同定のために、生化学アッセイ、PHESSELLECTOR (米国特許第 7521541 号; Junutula JR et al. "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs" *J Immunol Methods* 2008;332:41-52) によ

30

40

50

る部位特異的結合の目的のために選択的に配置されたシステインを含有すように改変されたmAbを用いることで避けることができる。得られた抗体（THIOMAB）は続いて、結合親和性又は抗体足場の安定性における有害な影響を損なうことなく化学選択的及び部位特異的に細胞傷害性薬剤に結合される（Junutula JR et al. “Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index” (2008) Nat Biotechnol. 26:925-32）。

【0232】

イメージングの観点から、高い標的親和性及び最小限の非特異的取り込みが、最適な画質のために必要とされる。従って、部位特異的放射性標識化システイン改変抗体（THIOMAB）は、標的組織外の代謝物の非特異的な取り込みを最小限に抑えることができる結合親和性及び足場の安定性が不变なトレーサーを提供することができる。本発明による一態様は、新規なDfベースのチオール反応性二官能性試薬、マレイミドシクロヘキシルデスフェリオキサミン（Df-Chx-Mal）、プロモアセチルデスフェリオキサミン（Df-Bac）及びヨードアセチルデスフェリオキサミン（Df-Iac）（図20）を用いる、THIOMABの部位特異的放射性標識のための方法である。典型的な実施態様は、これらの試薬が部位特異的にトラスツズマブTHIOMAB（チオトラスツズマブ）へ結合され、⁸⁹Zrとキレート化され、インピトロ及びインピボで評価される場合を含む。

【0233】

ジルコニウムの一つの準安定異性体は、ベータ（電子放出）、陽電子（ベータプラス）、及びガンマ線の崩壊様式により78.4時間の半減期を持つ⁸⁹Zrである。

【0234】

放射性同位体又は他の標識は、既知の方法で複合体に組み込むことができる（Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57; "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" Chatal, CRC Press 1989。炭素14標識化1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン5酢酸(isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid)は抗体への放射性核種の結合のための典型的なキレート剤である（国際公開第94/11026号）。

【0235】

「リンカー」（L）は二官能性又は多官能性成分であり、一又は複数のジルコニウム錯体成分（Z）及び抗体ユニット（Ab）を結合させることができ、式Iの抗体-ジルコニウムコンジュゲート（AZC）を形成する。抗体-ジルコニウムコンジュゲート（AZC）はジルコニウムおよび抗体に結合するための反応性官能基を有するリンカーを用いて都合良く調製することができる。システイン改変抗体（Ab）のシステインチオールは、リンカー試薬、ジルコニウム標識成分、又はジルコニウムリンカー中間体の官能基と結合を形成することができる。

【0236】

一態様にて、リンカーは、抗体上に存在する求核システインに対して反応性である電子性基を有する反応性部位を有する。抗体のシステインチオールはリンカー上の求電子性基と反応性であり、リンカーに共有結合を形成している。有用な求電子性基は、マレイミド及びハロアセトアミド基を含むが、これらに限定されない。

【0237】

システイン改変抗体は、Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773の766頁の結合方法、及び、実施例17-19のプロトコールによれば、マレイミド又は-ハロカルボニルなどの求電子性官能基と、リンカー試薬又はジルコニウム-リンカー中間体と反応する可能性がある。

【0238】

その他の実施態様において、Z成分は同一である。

【0239】

10

20

30

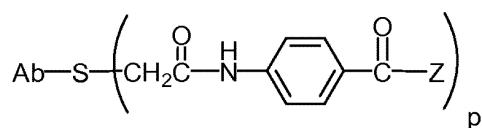
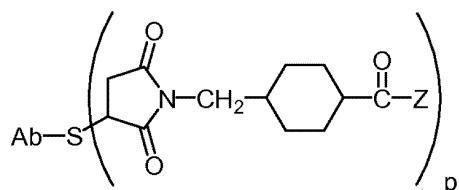
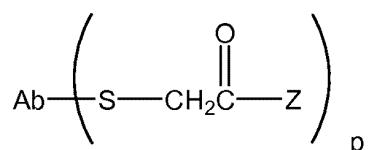
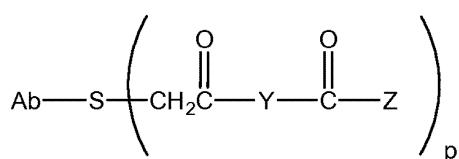
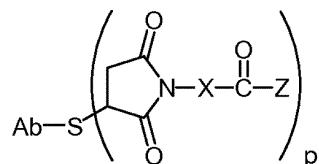
40

50

更に別の実施態様において、Z成分は異なる。

【0240】

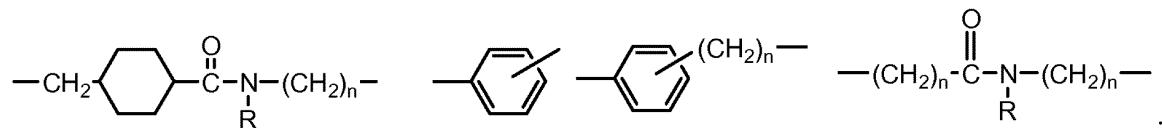
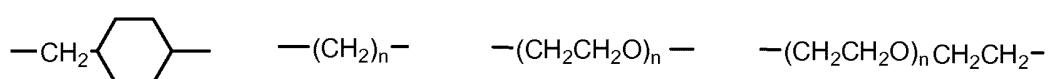
式Iの抗体-ジルコニウムコンジュゲート(AZC)化合物は



10

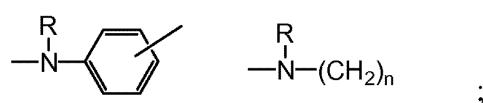
20

を含み、ここでXは、



30

Yは、



であって、Rは独立して、H又はC₁ - C₆アルキルであり、nは1から12である。

【0241】

その他の実施態様において、リンカーは、抗体上に存在する電子性基に対して反応性である求核基を有する反応性官能基を持つ。抗体上の有用な求電子性基としては、アルデヒド及びケトンのカルボニル基を含むが、これらに限定されない。リンカーの求核基のヘテロ原子は、抗体上の求電子性基と反応し、抗体ユニットに共有結合を形成することができる。リンカーの有用な求核基としては、ヒドラジド、オキシム基、アミノ基、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、及びアリルヒドラジドを含むが、これらに限定されない。抗体上の電子性基はリンカーに付着するため都合の良い部位を与える。

40

【0242】

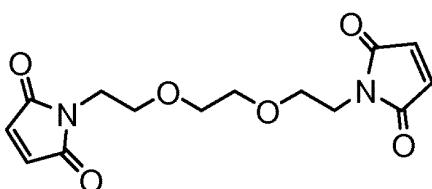
その他の実施態様において、リンカーは、溶解性又は反応性を調節した基で置換されることがある。たとえば、スルホン酸(-SO₃-)またはアンモニウム等の荷電置換基は、試薬の水への溶解度を増加させ、抗体またはジルコニウム成分とリンカー試薬のカップリング反応を容易にでき、又はAZCを調製するために用いる合成経路に依存して、Ab-L(抗体-リンカー中間体)のZとの、又は又はZ-L(ジルコニウム-リンカー

50

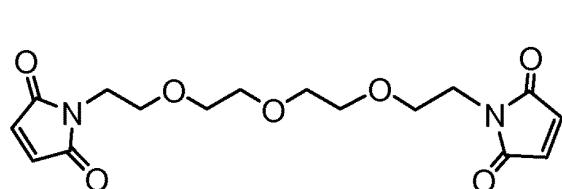
中間体)の A b とのカップリング反応を容易にすることができる。

【 0 2 4 3 】

本発明の化合物は、限定されないが、ピアースバイオテクノロジー社、カスタマーサービス部門（私書箱 117、ロックフォード、イリノイ州、61105 米国）から市販されているリンカー試薬：B M P E O、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C-S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ E M C S、スルホ G M B S、スルホ K M U S、スルホ M B S、スルホ S I A B、スルホ S M C C 及びスルホ S M P B、及び S V S B（サクシニミジル-（4-ビニルスルホン）安息香酸）、及びビスマレイミド試薬：D T M E、B M B、B M D B、B M H、B M O E、B M (P E O)₂、及び B M (P E O)₃で調製された A Z C を明白に意図するものである。ビスマレイミド試薬が連続的又は同時的方法で、チオール含有ジルコニウム成分、標識、又はリンカー中間体へのシステイン改変抗体のチオール基の付着を可能とする。マレイミド以外の官能基は、システイン改変抗体のチオール基、ジルコニウム成分、標識又はリンカー中間体と反応性であり、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、及びイソチオシアネートを含む。



BM(PEO)₂



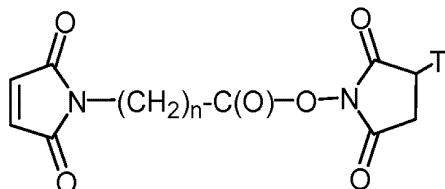
BM(PEO)₃

【 0 2 4 4 】

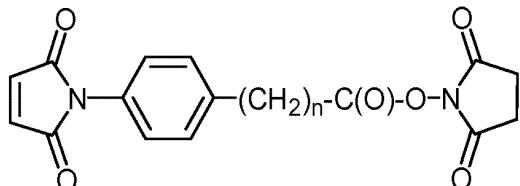
有用なリンカー試薬はまた、他の商業的供給源、例えばモレキュラーバイオサイエンス社（コロラド州ボルダー）を介して入手することができ、又は、Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186、米国特許第 6214345 号、国際公開第 02/088172 号、米国特許出願公開第 2003130189 号、米国特許出願公開第 2003096743 号、国際公開第 03/026577 号、国際公開第 03/043583 号、及び国際公開第 04/032828 号に記載の手順に従って合成することができる。

【 0 2 4 5 】

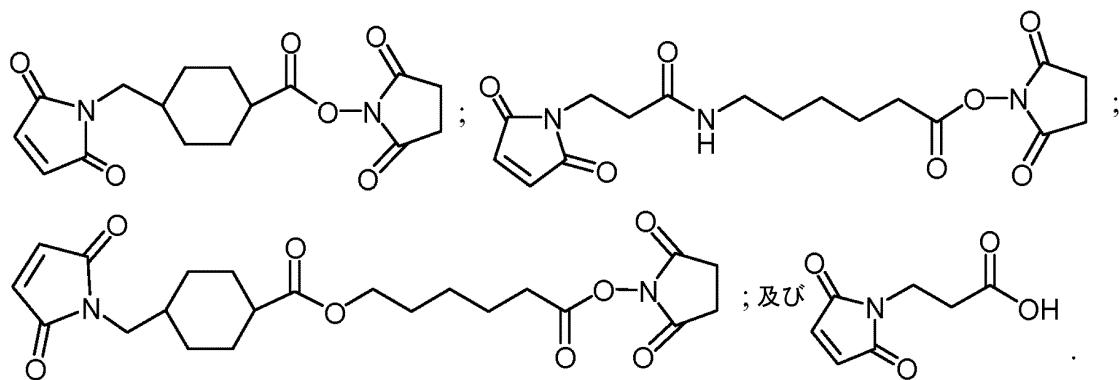
典型的なリンカー試薬は、



ここで n は 1 - 10 の範囲の整数であり、T は -H 又は -SO3Na である；



ここで n は 0 - 3 の範囲の整数である；



10

を含む。

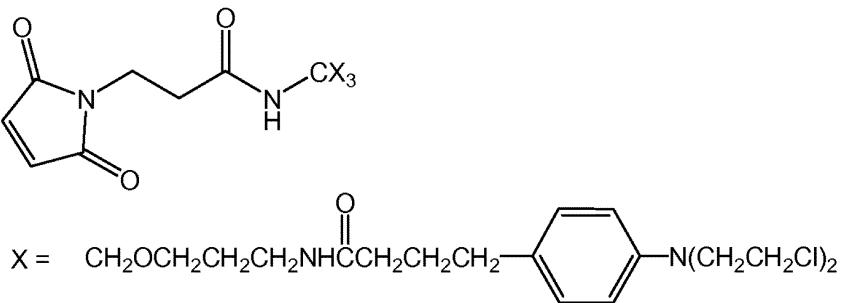
【0246】

その他の実施態様において、リンカーレは、複数のジルコニウム成分が、分岐する多官能性リンカーレ成分を介して抗体へ共有結合するための樹枝状型リンカーレであり得る(Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768)。樹枝状リンカーレは、抗体に対するジルコニウムのモル比、すなわちAZCの負荷を増やすことができる。したがって、システイン改変抗体が1つの反応性システインチオール基のみを持つ場合、多数のジルコニウム成分を樹枝状リンカーレを介して結合させることができる。

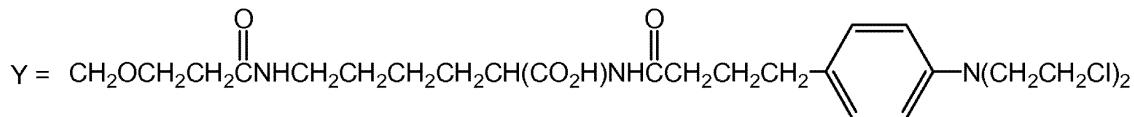
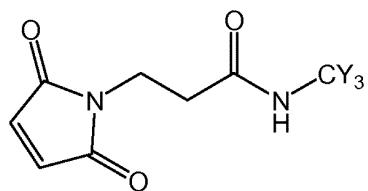
20

【0247】

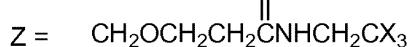
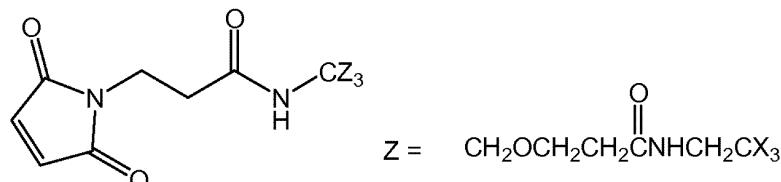
樹枝状リンカーレ試薬の次の例示的な実施態様は、9つまでの求核性ジルコニウム成分の試薬がクロロエチルナイトロジエンマスター官能基との反応により結合されることを可能とする：



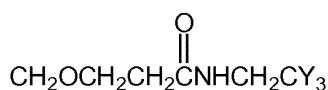
30



10



又は



20

【0248】

分岐状、樹枝状リンカーの他の実施態様は自壊的 (self-immolative) 2,6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾール及び2,4,6-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノール デンドリマー単位によるものを含む(国際公開第2004/01993号; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499)。

【0249】

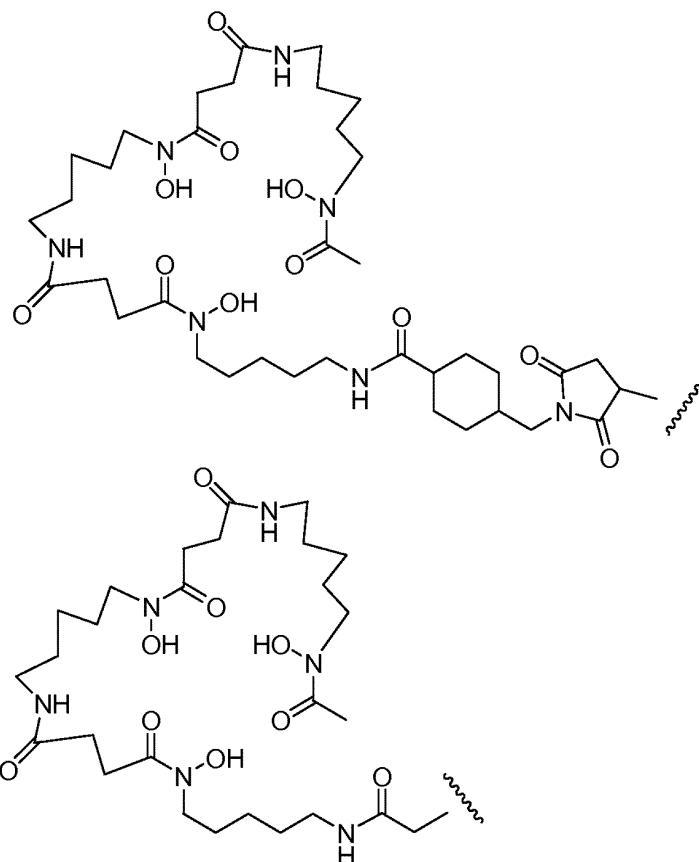
デスフェリオキサミン-標識化、システイン改変抗体

本発明の一態様は、遊離システインアミノ酸を介してリンカー (L) 及びデスフェリオキサミン成分 (Df) に結合したシステイン改変抗体 (Ab) を含む、デスフェリオキサミン標識されたシステイン改変抗体であり、式IIを有する。

30



ここで L - Df は



から選択され、ここで波線は抗体 (A-b) への結合を示し、及び p は 1 から 4 である。

【0250】

抗体-ジルコニウムコンジュゲートの調製

式 I の抗体 - ジルコニウムコンジュゲート (A Z C) は、当業者に公知の有機化学反応、条件及び試薬を用いて、いくつかの経路によって調製することができ、(1) システイン改変抗体のシステイン基をリンカー試薬と反応させ、共有結合を介した抗体 - リンカー中間体 A B - L を形成し、続いて活性化ジルコニウム標識成分 Z と反応させ、(2) ジルコニウム基の求核基をリンカー試薬との反応させ、共有結合を介したジルコニウム標識リンカー中間体 Z - L を形成し、続いてシステイン改変抗体のシステイン基と反応させる、ことを含む。結合方法 (1) と (2) は、式 I の抗体 - ジルコニウムコンジュゲートを調製するために、さまざまなシステイン改変抗体、ジルコニウム標識成分、及びリンカーを使用することができる。

【0251】

抗体のシステインチオール基は、求核性であり、リンカー試薬及びジルコニウム - リンカー中間体上の求電子基と共有結合を形成するために反応することができる、(i) 活性エステル、例えば NHS エステル、HOBT エステル、ハロホルマート (haloformates) 、および酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基及びマレイミド基；及び(iv) 硫化物交換によるピリジルジスルフィドを含むジスルフィドを含む。ジルコニウム標識成分上の求核基としては、限定されないが、リンカー成分およびリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するために反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、アリールヒドラジド基を含む。

【0252】

所定の条件下では、システイン改変抗体は、DTT (クリーランドの試薬、ジチオスレ

10

20

30

40

50

イトール)、又はT C E P(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩; Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)等の還元剤で処理することにより、リンカー試薬との結合のために反応性になりうる。CHO細胞で発現される完全長システイン改変モノクローナル抗体(Thiomab)が、新たに導入されたシステイン残基及び培地中に存在するシステインの存在の間に形成する可能性のあるジスルフィド結合を還元するために、37で3時間T C E Pの約50倍過剰で還元された。還元されたThiomabは10mM酢酸ナトリウムpH5で希釈され、HiTrap Sカラム上にロードされ、0.3M塩化ナトリウムを含むPBSで溶出した。ジスルフィド結合は、一晩室温で希釈した(200nM)水性硫酸銅(CuSO₄)とともに親モノクローナル抗体中に存在するシステイン残基との間で再形成された。当技術分野で公知の他の酸化体、すなわち、酸化剤、及び酸化条件を使用することができる。周囲の空気酸化もまた有効である。この穏やかな、部分的な再酸化工程は、高忠実度で効率的に鎖内ジスルフィドを形成する。ジルコニウム-リンカー中間体の約10倍過剰を加え、混合し、結合を生じさせ、Thiomab-ジルコニウムコンジュゲートを形成するために室温で1時間ほど放置された。結合混合物をゲル濾過し、ロードされ、過剰なジルコニウム-リンカー中間体および他の不純物を除去するためにハイトラップSカラムを通して溶出される。

【0253】

図15は、結合のための細胞培養から発現されたシステイン改変抗体を調製するための一般的な方法を示す。システイン付加体は、恐らくは様々な鎖間ジスルフィド結合とともに還元的に切断され、抗体の還元型を与える。対のシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、周囲の酸素への暴露など部分的酸化条件の下で再形成される。新たに導入され、改変された不対システイン残基は、本発明の抗体コンジュゲートを形成するため、リンカー試薬又はジルコニウム-リンカー中間体と反応させるためにいつでも利用できる状態である。哺乳動物細胞株で発現されたThiomabは、改変されたCysへ-S-S-結合形成により、外部に結合したCys付加体をもたらす。したがって、精製されたThiomabは、反応性Thiomabを生成するために実施例11に記載の酸化還元の手続きで処理する必要がある。これらのThiomabは、マレイミドを含む放射性標識、細胞毒性薬、フルオロフォア、及びその他の標識と結合するために用いられる。

【0254】

^{8,9}Zr-D F-トラスツズマブコンジュゲートの調製及び分析

保護された活性エステルTFP-N-SucDf-Feは、前述の手順に従って調製し(Verel I et al “89Zr Immuno-PET: Comprehensive Procedures For The Production Of 89Zr-Labeled Monoclonal Antibodies” (2003) *J Nucl Med* 44:1271-81)、TFP-N-SucDf-Feの5倍モル過剰を使用してトラスツズマブに結合させ、デスフェリオキサミンを平均1.6分子を持つN-SucDf-トラスツズマブを得た(表8)。Df-Bz-SCN-トラスツズマブは、pH8.5でDf-Bz-SCNの8倍モル過剰をカップリングすることによって得られた(Perk LR, et al. “Facile radiolabeling of monoclonal antibodies and other proteins with zirconium-89 or gallium-68 for PET Imaging using p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine” (2008) *Nature Protocols*; published online: DOI:10.1038/nprot.2008.22)。反応はデスフェリオキサミンの平均2.4分子で装飾されたDf-Bz-SCN-トラスツズマブを与えた(表1)。

【0255】

マレイミドに基づいた新規なチオール反応性二官能性リンカーであるDf-Chx-Ma1は、デスフェリオキサミンメシル酸塩とSMCCの等モル量から調製した(図21、実施例13)。反応は室温で30分以内に完了し、生成物は水の添加により沈殿させることにより45%の収率及び95%以上の純度で単離した。新たに調製されたチオ-トラスツズマブとのDF-Chx-Ma1の8.5倍モル過剰の反応は(図21、実施例17)、1時間でデスフェリオキサミンの正確に2分子を持つDf-Chx-Ma1-チオ-トラスツズマブコンジュゲートを与えた(表1、図21)。プロモアセチルデスフェリオキサミン(B

10

20

30

40

50

Df-Bac) は、0 でのデスフェリオキサミンメシリ酸塩及びプロモアセチルプロミド等モル量の反応によって調製した(実施例 14)。生成物は HPLC 精製後に 14% の収率で得られた。新たに調製されたチオ-トラスツズマブの 12 倍モル過剰の Df-Bac によるアルキル化は(図 21、実施例 16)、抗体あたり 1.8 分子の Df を持つコンジュゲート(DF-Ac-チオ-トラスツズマブ)を 5 時間以内に与えた(表 8、図 21、実施例 18)。臭化物の低い反応性は、より反応性のヨード誘導体(DF-Iac)を探索することを私たちに促した。Df-Iac は N-ヒドロキシスクシンイミジルヨード酢酸のわずかに過剰とデスフェリオキサミンメシリ酸との反応により 53% の収率で調製された(図 21、実施例 15)。生成物は反応混合物から沈殿させることにより 95% 以上の純度で得られた。続く DF-Iac の 11 倍過剰の反応は、2 時間以内に Df の 1.8 分子で装飾された DF-Ac-チオ-トラスツズマブを与えた(表 1、図 21、実施例 19)。我々の経験に基づいて、Df-Chx-Mal は調べた 3 つの化合物の好ましい試薬である。特に、Df-Chx-Mal の反応は、Df-Bac 及び Df-Iac によるチオール基のアルキル化のために必要なより高い pH 及びより長い反応時間とは対照的に 1 時間以内に穏やかな pH で完了した。さらに、ハロアセトアミドの低い反応性は、チオトラスツズマブの利用可能なシステインの両方の不完全な負荷を引き起こしている可能性がある。

表 8. さまざまな試薬を用いて調製された Df-リンカー-トラスツズマブ複合体の反応条件及び収率

試薬	温度 [°C]	pH	試薬 過剰	反応時間 [時間]	負荷 [Df/Mab]
Fe-Df-N-Suc-TPP	37	8.5	5	1.5	1.6
Df-Bz-SCN	37	9	8	0.5	2.4
Df-Chx-Mal	25	7.5	8.5	1	2.0
Df-Bac	25	9	12	5	1.8
Df-Iac	25	9	11	2	1.8

【0256】

⁸⁹Zr は、前述の実験手順を使用して Df-トラスツズマブのすべての 4 つの亜種と ⁸⁹-ジルコニウムシュウ酸塩としてキレート化された(Verel I et al "89Zr immuno-PE T: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" (2003) J Nucl Med. 44:1271-81)。放射性標識タンパク質は、脱塩カラムで精製し、最終溶液は、膜濾過により必要量にまで濃縮された。⁸⁹Zr コンジュゲートの収量、純度、および最終的な比活性は、表 9 に要約される。一般的には、キレート化収率は、おそらくは抗体分子あたりの Df の少量、及び / 又は活性化及び結合の間キレート剤を保護するために使用される鉄(III)の不完全な除去に起因して、低収率で得られた Df-N-Suc リンカーの例外を除いて、80% を超えた。脱塩カラムを用いた Df-トラスツズマブ変異体の精製後、それぞれのサンプルで検出された高分子量の凝集体は少量(1-6%) で、生成物の純度は 90% 以上であった。Df-Chx-Mal-チオ-トラスツズマブは、低分子量不純物の約 8% 及び高分子量凝集体の 2% で汚染されていた Df-Ac コンジュゲートとは対照的に、純度 99% で ⁸⁹Zr 錯体を与えた(表 9)。汚染物質除去は NAP-10 カラムを用いた除去に抵抗したが、アミコンフィルター上で繰り返しバッファー交換を使うことで可能であった。

表 9. 放射標識された⁸⁹Zr-Df-リンカー-トラスツズマブの収率、比放射能、及び純度

リンカー	放射化学的収率 [%]	比放射能 [mCi/mg]	純度 [%]
N-Suc	60	2.2	98
Bz-SCN	81	2.9	94
Chx-Mal	87	3.4	99
Ac	84	3.2	90

10

【0257】

⁸⁹Zr-Df-トラスツズマブコンジュゲートの生物学的活性

新たに作製された部位特異的Df-リンカー-チオ-トラスツズマブコンジュゲートの生物学的活性は、スキャッチャード分析によるBT474乳癌細胞株に対する結合アッセイを用いて測定された。得られたK_D値は、非修飾トラスツズマブ(0.91±0.20nM)に対して比較した。Chx-Malリンカーを含むチオ-トラスツズマブコンジュゲートのK_Dは0.93±0.15nMであり、Acリンカーを含むコンジュゲートに対する値はDf-Bacを用いて調製されたコンジュゲートにおいて1.22±0.22nMであり、Df-Iacを用いて調製された複合体において0.87±0.15nMであった。生物学的活性の解析の結果は、チオトラスツズマブの修飾が、HER2に対する抗体の結合親和性に影響を及ぼさなかったことを示している。

20

【0258】

インビトロでの血清の安定性

以前に報告された、アミドまたはチオ尿素結合を含むN-Suc及びBz-SCNリンカーとのDf-抗体コンジュゲートは、血清中37で6日間にわたり、インビトロで安定していた(Verel I et al "89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labeled monoclonal antibodies" J Nucl Med 2003;44:1271-81; Perk L R et al, (2009) European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging 35(10):1857-1867)。Chx-Mal及びAcリンカーとの⁸⁹Zr-チオ-トラスツズマブコンジュゲートの安定性は37でマウス血清中で決定された。抗体結合した⁸⁹Zrの有意な損失は、5日間の期間内に観察されなかった。両方のチオコンジュゲートは、抗体結合⁸⁹Zrの平均損失が、⁸⁹Zr-Df-Chx-Mal-チオ-トラスツズマブにおいて1日たり1.8%であり、⁸⁹Zr-Df-Ac-チオ-トラスツズマブにおいて1日たり1.4%であり安定していた(図24)。高分子量種、おそらくは凝集体のゆっくりとした形成は、Df-Chx-Mal及びDf-Acリンカーの両方で観察された。

30

【0259】

インビオマイクロペット(MICROPET)イメージング

皮下のBT474M1異種移植片(サイズ~200立方ミリメートル)を有する二十の動物(各群5匹)に⁸⁹Zr-トラスツズマブを静脈内注射した。動物ごとに注入された抗体の量は1.4±0.29mg/kgであった。代表的な動物の(注射後(p.i.)96時間における)最大強度の投影画像が図3に示される。選択された組織での⁸⁹Zr-トラスツズマブの取り込みは図4に要約されている。1時間での画像(表示せず)は、親油性不純物の急速な肝胆道排泄が腸内で吸収の上昇をもたらしたDf-Bacの例外を除き、高い血液プールの取り込みにより支配されていた。不純物は完全に最初の24時間以内にクリアされ、小腸および大腸の取り込みの上昇はトレーサー注入後24時間又は以降の時点で検出されなかった。Df-Acコンジュゲートの組織の取り込みは、結果としてわずかに(~8%)低下したが、腫瘍対血液比率(表10)は注射された放射活性の損失により影響を受けなかった。96時間での画像は4つの異なる⁸⁹Zr-トラスツズマブ変異体の間で観察されたわずかな違いを示し、高い腫瘍取り込みにより支配されていた(図25)。腫瘍の取り込みは、各トレーサーについて同一であり、注射後24時間で最大値に到

40

50

達し、血中クリアランスのため 144 時間で最大の腫瘍対血液比率に到達した（表 10）。チオールに基づくコンジュゲートの ^{89}Zr -Df-Chx-Mal-チオ-トラスツズマブは、注射後 96 時間及び 144 時間でアミンに基づくコンジュゲート（Df-Bz-SCN 及び Df-N-Suc）と比較して、骨の取込みの上昇を示した（ $P < 0.05$ ）。Df-Ac-チオ-トラスツズマブの骨の取込みは Df-Bz-SCN リンカー及び Df-N-Suc リンカーと比較して有意には上昇しなかったが（ $P = 0.20$ ）、最初の 24 時間の間、放射活性の 8 % の損失を補正した場合には有意となり得る。抗体に基づくトレーサーで予想されるように、各トレーサーの腎取り込みは低かったが（図 26）、 ^{89}Zr -Df-Chx-Mal-チオ-トラスツズマブは、他のリンカーと 24 時間、96 時間及び 144 時間の時点で比較してわずかに高かった（ $P < 0.05$ ）。

10

表10 注射後24時間、96時間、及び144時間での腫瘍対血液比率の平均

リンカー	24 時間	96 時間	144 時間
N-Suc	1.8	3.8	6.0
Bz-SCN	2.0	4.0	5.7
Chx-Mal	2.0	4.9	7.1
Ac (Bac)	2.0	4.7	6.1

【0260】

B T 4 7 4 (HER2 の 3+ 発現レベル) 異種移植は、Dijkers らにより SKO V 3 (HER2 の 3+ 発現レベル) において以前測定された $33.4 \pm 7.7\% \text{ID/g}$ (Dijkers EC, et al. "Development and Characterization of Clinical-Grade ^{89}Zr -Trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET Imaging" (2009) J Nucl Med 50(6):974-981) よりも低いトレーサーの絶対的取込み（15 % ID/g）を示した。しかし、腫瘍対血液の比率が 5.7 - 7.1（表 10）とは SKO V 3 で得られた値（腫瘍対血液の比率が 7.6）に匹敵する。腫瘍の取り込みの違いは、腫瘍モデル及びトラスツズマブの総投与量に起因する可能性がある。高い比活性を有する材料が使用され、従って、Dijkers らの SKO V 3 による研究（100 μg 、4 mg/kg）と比較して、著しく少ない抗体が注射された（35 μg 、1.4 mg/kg）。比活性の違いもまた、SKO V 3 モデル（5-10 % ID/g）に比較して、本明細書の実験において 2-3 % ID/g という、遊離の ^{89}Zr の低い骨の取込みに寄与した可能性がある。残念ながら、骨の取り込みの上昇に関してはいかなる指南も Dijkers らによって与えられてない。ジルコニウムは、血漿タンパク質を結合することが知られている (Mealey J, Jr. "Turn-over of carrier-free zirconium-89 in man" (1957) Nature 179:673-4 and is later deposited in mineral bone (Fletcher CR. "The radiological hazards of zirconium-95 and niobium-95" (1969) Health Phys. 16:209-20; Shiraishi Y and Ichikawa R. "Absorption and retention of 144 Ce and 95 Zr-95 Nb in newborn, juvenile and adult rats" (1972) Health Phys. 22:373-8)。注射された物質は、遊離の ^{89}Zr が含まれていなかったので、骨の取り込みは ^{89}Zr 抗体の分解から、又は、Df に結合した ^{89}Zr と比較して血漿タンパク質とトランスキレート化しうる非特異的に抗体と結合した ^{89}Zr から由来する可能性がある。

20

【0261】

システイン改変抗体のシステインのチオール基を介する、デスフェリオキサミン (Df) のモノクローナル抗体への化学選択的結合のために、三つのチオール特異的試薬が本明細書に例示されている。チオール特異的 Df 試薬は、デスフェリオキサミン B のアミノ基のアシル化により、14 % (Df-Bac)、53 % (Df-Iac) 及び 45 % (Df-Chx-Mal) の収率で得られ、チオトラスツズマブへ結合させ、改変されたシステインの両方で 1-5 時間以内に部位特異的修飾をもたらす。HER2 に対する部位特異的チオトラスツズマブコンジュゲートの結合活性は、非修飾トラスツズマブの活性と同一である。

30

40

50

った。D f 修飾チオトラスツズマブ (D f - A c - チオトラスツズマブ及びD f - C h x - M a 1 - チオトラスツズマブ) は、前述のD f - B z - S C N リンカー及びD f - N - S u c リンカーを用いて調製されたリジンコンジュゲートに匹敵し、1時間以内に80%を超える収率で^{8 9} Z r とキレート化された(図22)。^{8 9} Z r - D f - A c - チオトラスツズマブ及び^{8 9} Z r - D f - C h x - M a 1 チオトラスツズマブの両方ともマウス血清中に匹敵する安定性を示した。両化合物はまた、B T 4 7 4 M 1 乳癌モデルにおいて、腫瘍対血液の比率が6.1から7.1の範囲で腫瘍の取込みが10-15% I D / g に到達し、リジンコンジュゲートに匹敵するP E Tイメージング機能を示した。全体的に新規試薬は容易に利用可能であり、タンパク質のチオール基との良好な反応性を示し、^{8 9} Z r との非常に良好なキレート化特性を示した。^{8 9} Z r 標識化抗体は血清中で安定しており、優れたP E Tイメージング特性を示した。D F - C h x - M a 1 はシスティンの側鎖を介してD f が抗体に結合するための有用な試薬であり、D f - B a c 及びD f - I a c に対して幾つかの利点を示した。まず、D f - B a c 及びD f - I a c におけるp H 9 及び2又は5時間と比べて、中程度のp H 7.5 が1時間以内でのD f - C h x - M a 1 の完全な結合のために必要とされた。更に、部位特異的に^{8 9} Z r 標識された改変T H I O M A B コンジュゲートが、生物医学研究におけるP E Tイメージングアプリケーションのための貴重なツールとして、^{1 8} F 標識されたT H I O M A B コンジュゲートと同様に用いることが可能である(Gill HS, et al. "A modular platform for the rapid site-specific radiolabeling of proteins with 18F exemplified by quantitative positron emission tomography of human epidermal growth factor receptor 2" (2009) Jour. of Med. Chem. 52:5816-25)。

【0262】

抗体-ジルコニウムコンジュゲートの投与

本発明の抗体-ジルコニウムコンジュゲート(A Z C)は治療されるべき疾患に適した任意の経路で投与され得る。A Z Cは、通常、非経口的に、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内、及び硬膜外に投与され得る。

【0263】

薬学的製剤

本発明の治療上の抗体-ジルコニウムコンジュゲート(A Z C)の薬学的製剤は、典型的に、薬学的に許容可能な非経口用ビヒクリルと共に単位用量注入用形態で、非経口的投与、すなわちボーラス、静脈内、腫瘍内注入のために調製される。所望の純度を持つ抗体-ジルコニウムコンジュゲート(A Z C)は、場合によって、薬学的に許容される希釈剤、担体、賦形剤又は安定化剤と、凍結乾燥又は水溶液の形態に混合される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。

【0264】

許容される希釈剤、担体、賦形剤及び安定化剤は、用いられる用量と濃度で生物源レシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトарат及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベニジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はブロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む、单糖、二糖および他の炭水化物；E D T A等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Z n - タンパク質コンジュゲート)；及び/又はT W E E N T M 、P L U R O N I C S T M 又はポリエチレングリコール(P E G)等の非イオン性界面活性剤を含む。例えば、凍結乾燥した抗E r b B 2 抗体製剤は国際公開97/04801号に記載されており、出典明記によ

10

20

30

40

50

つて本明細書中に特別に援用される。

【0265】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルションに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている

【0266】

10

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好ましい例は、AZCを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。

【0267】

20

インピボ投与に使用する製剤は、無菌でなければならず、それは滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0268】

製剤は、上記の投与経路に適したものを含む。製剤は、単位用量形態で都合良く提示することができ、製薬の分野で公知の任意の方法によって調製することができる。技術及び製剤は、一般的にレミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(マック出版社、イーストン、ペンシルベニア州)に記載されている。そうした方法は、1つ又は複数の副成分を構成する担体と有効成分の会合もたらす工程を含む。一般に、製剤は、均一かつ密接に液体担体又は微粉碎固体担体もしくはその両方の有効成分との会合をもたらし、必要あらば製品を成形することによって調製される。

30

【0269】

本発明の水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤と混合した活性物質を含む。そのような賦形剤には、懸濁剤、例えばナトリウムカルボキシメチルセルロース、クロスカルメローゼ、ポビドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム及びアカシアガム、及び分散又は湿潤剤、例えば天然に生じるホスファチド(例えばレシチン)、脂肪酸とのアルキレンオキシドの縮合産物(例えばポリオキシエチレンステアラート)、長鎖脂肪族アルコールとのエチレンオキシドの縮合産物(例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール)、脂肪酸とヘキシトール無水物から誘導された成分エステルとのエチレンオキシドの縮合産物(例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート)が含まれる。水性懸濁液はまた一又は複数の保存料、例えばエチル又はn-プロピルp-ヒドロキシ-ベンゾアート、一又は複数の着色剤、一又は複数の香味剤及び一又は複数の甘味料、例えばスクロース又はサッカリンを含みうる。

40

【0270】

AZC化合物の薬学的組成物は滅菌された注射用製剤の形態、例えば滅菌注射用水性又は油性懸濁液であってもよい。この懸濁液は上に述べた好適な分散又は湿潤剤及び懸濁剤を用いて公知技術に従って処方することができる。滅菌された注射用製剤はまた1,3-ブタン-ジオール溶液又は凍結乾燥粉末として調製したもののように、非毒性の非経口的に許容可能な希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用溶液又は懸濁液であってもよい。用いることができる許容可能なビヒクル及び溶媒は水、リンガー液及び等張塩化ナトリウム溶液である

50

。更に、滅菌固定化油を溶媒又は懸濁媒質として便宜的に用いることができる。この目的に対して、合成のモノ-又はジグリセリドを含む任意のブランドの固定化油を用いることができる。更に、オレイン酸のような脂肪酸も同様に注射剤の調製に使用することができる。

【0271】

単位投薬形態をつくるために担体物質と混合されうる活性成分の量は治療される宿主と特定の投与形式に応じて変わる。例えば、静脈点滴のための水溶液は、約30mL/hrの割合で適した体積の点滴が生じうるようにするために溶液1ミリリットル当たり約3から500μgの活性成分を含みうる。

【0272】

非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、バッファー、静菌剤及び意図したレシピエンントの血液と製剤を等張にする溶質を含みうる水性及び非水性滅菌注射用溶液；及び懸濁剤及び増粘剤を含みうる水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。

【0273】

タンパク質治療薬の経口投与は腸内での加水分解又は変性のため不利であるが、経口投与に適したAZC製剤は、カプセル剤、カシェ剤または錠剤等、各々AZCの所定量を含む個別の単位として調製することができる。

【0274】

製剤は、単位投薬又は複数投薬容器、例えば密封されたアンプル及びバイアルに包装することができ、使用直前に注射用の滅菌液体担体、例えば水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）条件で保存することができる。即時混合注射溶液及び懸濁液は既に記載された種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製される。好適な単位投薬製剤は、活性成分の、上に記載されたような毎日の投薬又は毎日の部分用量単位、又はその適切な画分を含むものである。

【0275】

本発明は更に獣医学的担体と共に上述の少なくとも一の活性成分を含む獣医学的組成物を提供する。獣医学的担体は組成物を投与する目的に有用な物質であり、不活性な又は獣医学分野で許容され活性成分と相容性がある固形、液体又は気体物質でありうる。これらの獣医学的な組成物は非経口的、経口的又は任意の他の所望の経路によって投与することができる。

【0276】

標識抗体のイメージング法

本発明の別の実施態様において、システイン改変抗体は、放射性核種、蛍光色素、生物発光トリガー基質成分、化学発光トリガー基質成分、酵素により、及び、診断、薬物動態、及び治療用途を持つイメージング実験のための他の検出標識によりシステインチオールを介して標識され得る。一般に、標識されたシステイン改変抗体、すなわち「バイオマーカー」又は「プローブ」は、例えば、ヒト、齧歯類、又は他の小動物などの生体、灌流臓器、又は組織試料に注射、灌流、または経口摂取により投与される。

【実施例】

【0277】

特に明記しない限り、溶媒は及び化学物質の評品は、アルドリッヂ（ミルウォーキー、ウィスコンシン州）から購入した。以下の逆相HPLCシステムが製品を分析し、精製するために使用された。システムA：UV吸光度、放射能検出器（PMT）を備えたPhenomenex BioSep-SEC-S3000（300×4.60mm, 5μm）50mMのPBS 0.5mL/分：システムB：UV検出器を備えたAltimax-18（100×22.0mm, 5μm）0.05%TFA+10-50%アセトニトリル, 0-30分, 24mL/分。低分子量生産物の質量分析は、オニキスモノリシックC₁₈カラムを備えたPE Sciex API 150EX LC/MSシステムで実施された。タンパク質のLC/MS分析は広範な質量範囲でTSQ量子三連四重極質量分析計で行われた（サーモエレクトロン、サーモフィッシャーサイエンティフィック社、アメリカ）。LC

10

20

30

40

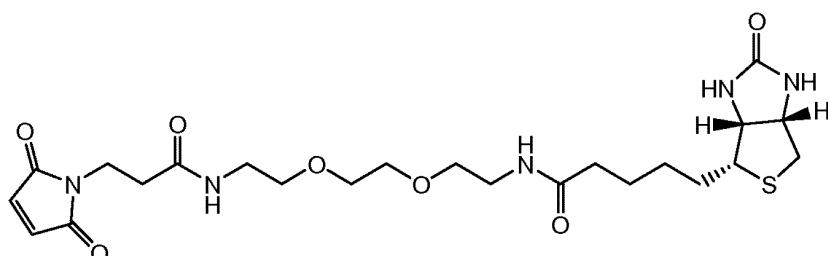
50

M S 分析用のタンパク質試料は、重鎖と軽鎖を分離するために 37 で 1 時間、 20 mM のジチオスレイトール (DTT) による処置で還元された。試料は 75 に加熱された P R L P - S 1000 マイクロボアカラム (50 mm × 2.1 mm , ポリマーラボラトリーズ、バリアン社、米国) 上でクロマトグラフされた。 30 - 40 % B (溶媒 A , 水中の 0.05 % TFA ; 溶媒 B , アセトニトリル中の 0.04 % TFA) からの直線勾配が用いられ、溶出液は、エレクトロスプレーソースを使用して直接イオン化した。データは Xcalibur データシステムによって収集され、デコンボリューションは、プロマス (Promass) ソフトウェアを使用して行った (Novatia 、モンマスジャパンクション、ニュージャージー州) 。 NMR スペクトルは、 Bruker Avance II 400 スペクトロメーターで 298 K において記録され、化学シフトは TMS に対して報告された。タンパク質濃度は、エッペンドルフ Biophotometer (ウェストベリー、ニューヨーク州) を用いて 280 nm で測定した。 ⁸⁹Zr は、 1 M シュウ酸溶液中で比放射能 470 - 1195 Ci / mmol を持つ ⁸⁹Zr (IV) シュウ酸塩として (Holland JP, et al (2009) " Standardized methods for the production of high specific -activity zirconium-89 " Nucl Med Biol. 36:729-39) 、スローンケタリング記念癌センター (ニューヨーク、ニューヨーク州) から得た。ヘテロ二官能性リンカーのサクシニミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボン酸塩 (SMCC) はピアス (ロックフォード、イリノイ州) から購入し、 N-ヒドロキシサクシニミジルヨード酢酸は Indofine チミカル・カンパニー (ヒルズボロ、ニュージャージー州) から得た。 NAP-10 カラムは (GE ヘルスケア、米国) から、アミコンウルトラ-4 遠心フィルター (10,000 MWCO) はミリポア (ビルリカ、マサチューセッツ州) から得た。 Df-Bz-SCN は Macro cyclics (ダラス、テキサス州) から購入した。

【 0278 】

実施例 1 ビオチン標識化 ThioFab ファージの調製

ThioFab ファージ (5 × 10¹² ファージ粒子) は、ビオチン-PEO-マレイミド ((+)-ビオチニル-3-マレイミドプロピオンアミジル-3,6-ジオキサオクタンジアミン (dioxaocetainediamine) 、 Oda et al (2001) Nature Biotechnology 19:379-382, ピアスバイオテクノロジー社) の 150 倍過剰で 3 時間室温で反応させた。過剰なビオチン-PEO-マレイミドは、 PEG 沈殿を繰り返して (3 - 4 回) ビオチン結合ファージから除去された。システインのチオール基と反応性である求電子基を持つ他の市販のビオチン化試薬を使用することができ、ビオチン-BMCC 、 PEO-ヨードアセチルビオチン、ヨードアセチル-LC-ビオチン、及びビオチン-HPDP (ピアスバイオテクノロジー社) 及び N-(3-マレイミジルプロピオニル)ビオチン (MPB 、モレキュラープローブ、ユージーン、オレゴン州) を含む。ビオチン化、二官能性及び多官能性リンカー試薬の他の商業的供給源は、モレキュラープローブ (Molecular Probes) (ユージーン、オレゴン州) 、及びシグマ (Sigma) (セントルイス、ミズーリ州) を含む。



ビオチン-PEO-マレイミド

【 0279 】

実施例 2 PHESELCTOR アッセイ

ウシ血清アルブミン (BSA) 、 ErbB2 の細胞外ドメイン (HER2) 及びストレプトアビシン (2 μg / ml の 100 μl) が別々に Maxisorp 96 穴プレート上

10

20

30

40

50

にコーティングされた。0.5%のTween 20 (PBS中)でブロックした後、ビオチン標識化及び非ビオチン標識化hu4D5Fabv8-ThiоФab-ファージ(2×10¹⁰ファージ粒子)が室温で1時間インキュベートされ、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識二次抗体(抗M13ファージコートタンパク質、pVIIITanパク質抗体)とインキュベートされた。図8はFab又はThiоФabのHER2への結合(上)及びビオチン標識化したThiоФabのストレプトアビジンへの結合(下)を示す。標準HRP反応を実施し、吸光度を450nmで測定した。チオール反応性は、ストレプトアビジンに対するOD₄₅₀/HER2に対するOD₄₅₀の比を計算することによって測定した。チオール反応性の値が1とは、システインのチオールの完全なビオチン標識化を示している。Fabタンパク質結合の測定の場合にはhu4D5Fabv8(2-20ng)が用いられ、その後HRP標識したヤギポリクローナル抗Fab抗体とインキュベーションを行った。

【0280】

実施例3a ThiоФabの発現及び精製

ThiоФabは非抑制因子大腸菌(E.coli)株である34B8の中で誘導によって発現された(Baca et al (1997) Journal Biological Chemistry 272(16):10678-84)。収穫細胞ペレットをPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に再懸濁し、全細胞溶解は、マイクロフルイダイザーを通過することにより行い、ThiоФabはプロテインG SEPHAROSETM(アマシャム)による親和性クロマトグラフィーで精製された。ThiоФabのL-V15C、L-V110C、H-A88C、及びH-A121Cが発現され、プロテインG SEPHAROSETMカラムクロマトグラフィーで精製された。オリゴマーのFabはフラクションの26から30に存在し、単量体型の大半はフラクションの31-34にあった。単量体型を含むフラクションはプールされ、野生型hu4D5Fabv8とともにSDS-PAGEで分析され、SDS-PAGE上で(DTT又はBMEでの)還元状態で、及び(DTT又はBME無しでの)非還元状態で分析された。A121C-ThiоФabのゲルfiltrationは非還元SDS-PAGE上で分析された。

【0281】

上記のようにThiоФabはビオチン-PEO-マレイミドと結合し、ビオチン標識化したThiоФabは更にSuperdex-200TM(アマシャム)ゲルfiltrationで精製され、遊離のビオチン-PEO-マレイミド及びThiоФabのオリゴマー画分を除去した。野生型hu4D5Fabv8及びhu4D5Fabv8 A121C-ThiоФab(量で0.5mg)は室温で3時間、ビオチン-PEO-マレイミドの100倍過剰でそれぞれ別々にインキュベートし、Superdex-200ゲルfiltrationカラムへロードし、遊離のビオチン並びに単量体型からオリゴマーFabを分離した。

【0282】

実施例3b ThiоФabの分析

ビオチン標識化hu4D5Fabv8(A121C)ThiоФab及び野生型hu4D5Fabv8は、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)で分析された。ビオチン標識化hu4D5Fabv8(A121C)の48294.5一次質量及び野生型hu4D5Fabv8の47737.0一次質量の差異は557.5質量単位であった。この断片は单一のビオチン-PEO-マレイミド成分(C₂₃H₃₆N₅O₇S₂)の存在を示す。表4は、配列を確認する断片化の値の割り当てを示す。

【0283】

表 4. トリプシン消化後のビオチン標識化 hu4D5Fabv8 ThioFab A121C の LC-ESI-質量スペクトル分析

アミノ酸	b 断片	y 断片
A (アラニン)	72	
M (メチオニン)	203	2505
D (アスパラギン酸)	318	2374
Y (チロシン)	481	2259
W (トリプトファン)	667	2096
G (グリシン)	724	1910
Q (グルタミン)	852	1853
G (グリシン)	909	1725
T (スレオニン)	1010	1668
L (ロイシン)	1123	1567
V (バリン)	1222	1454
T (スレオニン)	1323	1355
V (バリン)	1422	1254
S (セリン)	1509	1155
S (セリン)	1596	1068
C (システイン) + ビオチン	2242	981
S (セリン)	2329	335
T (スレオニン)	2430	248
K (リジン)		175

【0284】

Superdex-200 ゲルfiltration の前後で、DTT 又は BME による還元とともに及び還元無しで、ビオチン標識化 ABP-hu4D5Fabv8-A121C、ビオチン標識化 ABP-hu4D5Fabv8-V110C、ビオチン標識化 2 重システイン ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A88C)、及びビオチン標識化 2 重システイン ABP-hu4D5Fabv8-(V110C-A121C) の SDS-PAGE ゲル分析を行った。

【0285】

hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPERO-DM1 の質量分析 (MS/MS) (Superdex-200 ゲルfiltration 精製後) : Fab+1 51607.5, Fab 50515.5. このデータは、91.2% の結合を示している。hu4D5Fabv8-(V110C)-BMPERO-DM1 (還元) の MS/MS 分析 : LC 23447.2, LC +1 24537.3, HC (Fab) 27072.5. このデータは全ての DM1 の結合は Fab の軽鎖上にあることを示している。

10

20

30

40

50

【0286】

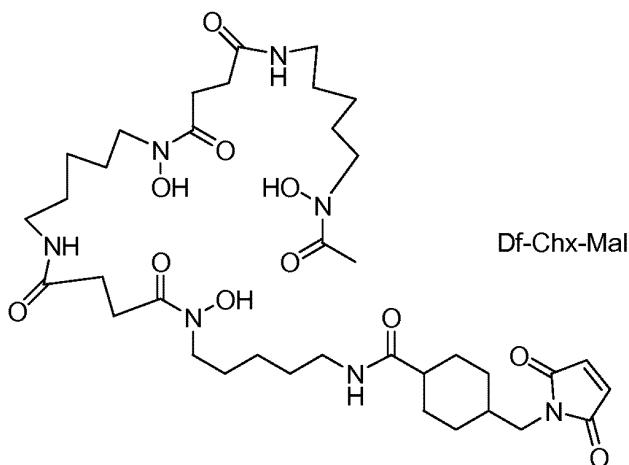
実施例11 結合のためのThioMabの還元/酸化

CHO細胞で発現された完全長システイン改変抗体(ThioMabs)は、37で3時間、TCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; ソルテック・ベンチャーズ、ビバリー、マサチューセッツ州)の約50倍過剰で還元された。還元したThioMab(図15)は希釈され、10mMの酢酸ナトリウム、pH5中で希釈されHiTrap Sカラム上でロードし、0.3Mの塩化ナトリウムを含むPBSで溶出した。溶出された還元型ThioMabは室温で一晩200nMの水性硫酸銅(CuSO₄)で処理した。周囲の空気酸化も有効であった。

10

【0287】

実施例13 N-[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル]デスフェリオキサミン(Df-Chx-Mal)



20

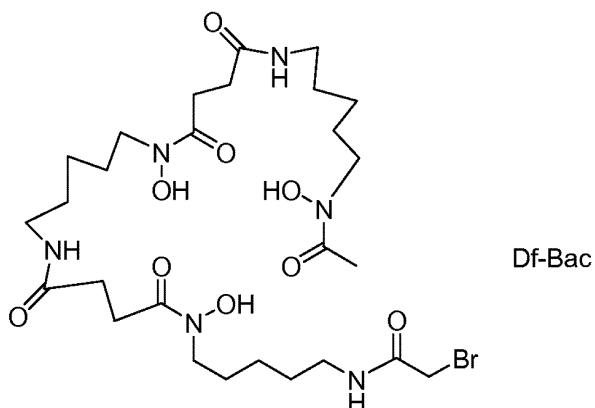
N-[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩(SMCC、40mg、0.12mmol)、デスフェリオキサミンメシル酸塩(78mg、0.12mmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(22μL、0.13mmol)をDMF(2.0mL)及び0.2mLの水の混合物に溶解した(図21)。得られた混濁溶液を30分間室温で攪拌した。水(8mL)を添加し、沈殿した生成物が濾過によって単離され、水で洗浄し、減圧下で乾燥させ、白色固体として42mg(45%)のN-[4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル]デスフェリオキサミン(Df-Chx-Mal)を生じた(図20下)。¹H NMR(400MHz, d₆-DMSO) 0.87-0.90(m, 2H), 1.20-1.26(m, 8H), 1.35-1.41(m, 6H), 1.45-1.55(m, 8H), 1.60-1.70(m, 4H), 1.97(s, 3H, アセチル), 2.26-2.29(m, 4H), 2.56-2.60(m, 4H), 2.95-3.05(m, 6H), 3.24(d, J = 7.0 Hz, 2H), 3.44-3.48(m, 6H), 7.00(s, 2H, マレイミド), 7.62(t, J = 5.4 Hz, 1H, アミド), 7.75(m, 2H, アミド), 9.59(s, 2H, ヒドロキシル), 9.64(s, 1H, ヒドロキシル)。MS ESI (m/z): [M+H]⁺ C₃₇H₆₂N₇O₁₁ の計算値は780.44; 測定値は780.6。

30

【0288】

実施例14 N-プロモアセチルデスフェリオキサミン(Df-Bac)

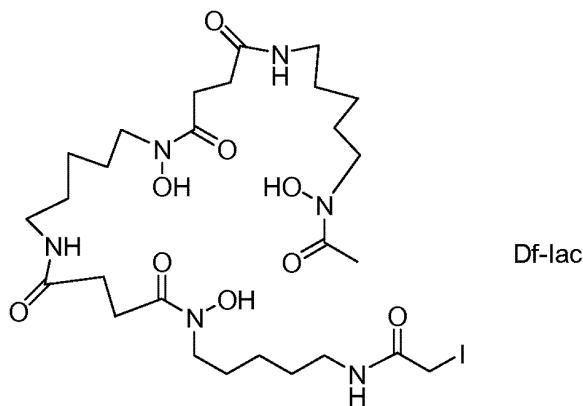
40



D MF (1 mL) 中のプロモアセチルプロミドの溶液 (27 μ L , 0.30 mmol) を D MF (5 mL) 中のデスフェリオキサミンメシル酸塩 (200 mg , 0.30 mmol) 及び N , N-ジイソプロピルエチルアミン (106 μ L , 0.60 mmol) の冷却 (0) 混合物中へ 5 分間滴下し、その後反応混合物は 0 度で 4 時間攪拌した (図 21)。水 (10 mL) を添加し、HPLC (システム B , 保持時間 7.5 分) を用いて生成物を単離し、白色固体として 29 mg (14 %) の N-プロモアセチルデスフェリオキサミン (Df-Bac) を得た (図 20 下)。¹H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) 1.18-1.26 (m, 6H), 1.35-1.42 (m, 6H), 1.45-1.55 (m, 6H), 1.97 (s, 3H, アセチル), 2.24-2.30 (m, 4H), 2.54-2.59 (m, 4H), 2.96-3.07 (m, 6H), 3.44-3.47 (m, 6H), 3.82 (s, 2H, プロモアセチル), 7.74 (m, 2H, アミド), 8.21 (t, 1H, アミド), 9.59 (s, 2H, ヒドロキシル), 9.63 (s, 1H, ヒドロキシル)。MS ESI (m/z): [M+H]⁺ $C_{27}H_{50}BrN_6O_9$ の計算値は 681.27, 683.27; 測定値は 681.1, 683.0。

【 0 2 8 9 】

実施例 15 N-ヨードアセチルデスフェリオキサミン (Df-Iac)



デスフェリオキサミンメシル酸 (200 mg, 0.30 mmol) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (53 μ L, 0.30 mmol) が DMF (4 mL) 及び水 (0.4 mL) に混合された。N-ヒドロキシスクシンイミジルヨード酢酸 (93 mg, 0.33 mmol) が添加され、得られた混合物は室温で 1 時間攪拌された (図 21)。水 (8 mL) を添加し、沈殿した生成物が単離され、水で洗浄し、減圧下で乾燥させ、白色固体として 115 mg (53%) の N-ヨードアセチルデスフェリオキサミン (Df-Iac) を生じた (図 20 下)。¹H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) 1.20-1.25 (m, 6H), 1.35-1.42 (m, 6H), 1.47-1.54 (m, 6H), 1.97 (s, 3H, acetyl), 2.25-2.29 (m, 4H), 2.56-2.59 (m, 4H), 2.98-3.03 (m, 6H), 3.45 (m, 6H), 3.61 (s, 2H, iodoacetyl), 7.75 (m, 2H, amide), 8.17 (t, 1H, amide), 9.57 (s, 2H, hydroxyl), 9.61 (s, 1H, hydroxyl). MS ESI (m/z): [M+H]⁺ $C_{22}H_{25}INO_6O$ の計算値は 729.26; 測定値は 729.1.

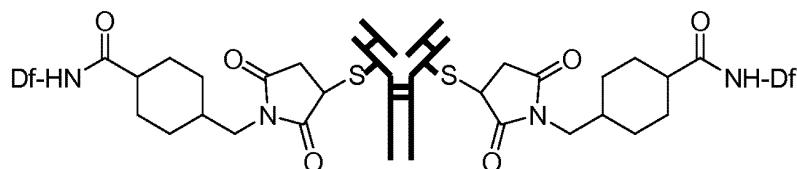
(0 2 9 0)

実施例 16 チオ-トラスツズマブ

重鎖における A 1 a ^{1 1 4} (K a b a t の番号付け) で C y s 置換された T H I O M A B の構築、発現、及び精製は以前に記載した (Junutula JR, et al " Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index " (2008) Nat Biotechnol 26:925-32) 。単離されたチオ-トラスツズマブは、 C y s ^{1 1 4} へ結合したジスルフィド付加体を除去するために、還元及び再酸化手順による結合のために調製された。最初に、タンパク質は 8 8 m M トリス緩衝液 pH 7.5 中で、 40 倍モル過剰の D T T 及び 2 m M の E D T A で処理することにより 24 時間還元された。再酸化の前に D T T を除去するため、チオ-トラスツズマブ溶液は 10 m M のコハク酸ナトリウム緩衝液の添加により pH を 5 に調整した。次いで溶液は、滅菌され、 10 m M コハク酸ナトリウム緩衝液 pH 5 で平衡化されたイオン交換カラム (H i T r a p F F 、 GE ヘルスケア) にロードされた。カラムを 10 m M コハク酸ナトリウム緩衝液 (10 m L) で溶出し、次いでチオ-トラスツズマブを 3 m L の 50 m M トリス、 150 m M の N a C l 緩衝液、 pH 7.5 で洗浄した。チオ-トラスツズマブの再酸化は、 75 m M トリス、 150 m M の N a C l 、 pH 7.5 緩衝液中、 25 ° C で 3.5 時間、デヒドロアスコルビン酸 (N, N -ジメチルアセトアミド (D M A) 中で 100 m M) の 25 倍モル過剰で処理することによって達成された。再酸化した後、チオ-トラスツズマブは、更に精製することなく、デスフェリオキサミンに結合させた。 MS ESI (m/z) : 測定値は軽鎖 23440.0, 重鎖 506 27.3 .

【 0291 】

実施例 17 D f - C h x - M a 1 - チオ-トラスツズマブ

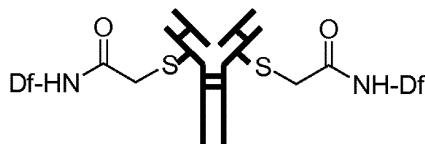


Df-Chx-Mal-ThioMab

二官能性キレート剤の 2 m M のストック溶液は、 D f - C h x - M a 1 (1.5 m g , 2 μ m o l) を D M F 及び D M A の 1 : 1 混合物 (1 m L) に 44 ℃ で 30 分間、溶解して調製し、ストック溶液は次いで分注され - 80 ℃ で保存した (図 21) 。ストック溶液の分注 (220 μ L , 0.440 μ m o l) は次いで、 50 m M トリス、 150 m M の N a C l 緩衝液 pH 7.5 (1.5 m L) 中のチオ-トラスツズマブ (7.5 m g , 52 n m o l) の溶液に添加され、室温で 1 時間インキュベートした。次いでその溶液は A m i c o n U l t r a - 4 フィルターで 0.25 M 酢酸ナトリウムにバッファー交換され、 6 m g / m L の濃度で 1 m L の D f - C h x - M a 1 - チオ-トラスツズマブコンジュゲート溶液を得た。 MS ESI (m/z) : 23440.2, 重鎖 51407.3 (図 23, D) .

【 0292 】

実施例 18 D f - B a c を用いる D f - A c - チオ-トラスツズマブ



Df-Ac-ThioMab

二官能性キレート剤の 12 m M ストック溶液は、 D f - B a c (8 m g , 12 μ m o l) を 1 m L の D M A に溶解して調製した (図 21) 。ストック溶液はついで分注され - 80 ℃ で保存した。再酸化されたチオ-トラスツズマブは A m i c o n U l t r a - 4 フィ

10

20

30

40

50

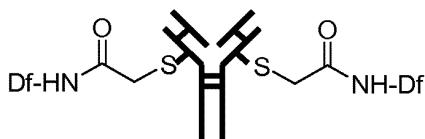
ルターで 0.05 M のホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 9 にバッファー交換された。Df-Bac ストック溶液の分注 (35 μL, 0.410 μmol) は、0.05 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 9 (1 mL) 中のチオ-トラスツズマブ (4.9 mg, 34 nmol) の溶液に添加され、室温で 5 時間インキュベートした。反応混合物を、NAP-10 カラムにロードし、Df-Ac-チオ-トラスツズマブを 0.25 M の酢酸ナトリウム緩衝液 1.5 mL で溶出し、3.2 mg/mL の濃度で生成物を得た。

MS ESI (m/z): 測定値は軽鎖 23440.1, 重鎖 51228.1 (図 23, B).

【0293】

実施例 19 Df-Iac を用いる Df-Ac-チオ-トラスツズマブ

10



Df-Ac-ThioMab

二官能性キレート剤の 11 mM ストック溶液は Df-Iac (8 mg, 11 μmol) を DMSO (1 mL) に溶解して調製し、次いで分注し、-80 で保存した (図 21)。チオ-トラスツズマブ溶液 (3.2 mL) は、0.1 M 炭酸ナトリウムを 0.5 mL 添加して pH 9 に調整された。ストック溶液の分注 (110 μL, 1.20 μmol) は次いで、50 mM トリス、150 mM の NaCl、0.0125 M 炭酸ナトリウム緩衝液中のチオ-トラスツズマブ (16 mg, 110 nmol) の溶液に添加され、室温で 2 時間インキュベートした。次いで溶液は Amicon Ultra-4 フィルターで 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液にバッファー交換され、8 mg/mL の濃度で 1 mL の Df-Ac-チオ-トラスツズマブコンジュゲートを得た。MS ESI (m/z): 測定値は軽鎖 23440.1, 重鎖 51228.3 (図 23, C).

20

【0294】

実施例 20 ^{89}Zr キレートを調製するための一般的な手順

1 M シュウ酸中の ^{89}Zr (IV) シュウ酸塩 (2-4 mM, 100 μL) の溶液は Na_2CO_3 (45 μL) の 2 M 溶液と混合し、室温で 3 時間インキュベートし、その後 0.5 M の HEPES 緩衝液 (0.15 mL) が添加された (図 22)。Df-チオ-トラスツズマブコンジュゲート (1 mg, 7 nmol) は 0.25 M 酢酸ナトリウム / 0.5 % ゲンチシン酸で最終体積 0.356 mL に希釈され、 ^{89}Zr 溶液へ添加した。最後に、HEPES 緩衝液の第二の部分 (0.350 mL) を追加し、全容量 1 mL を得た。混合物を 1 時間室温でインキュベートした。遊離の ^{89}Zr を除去するため、放射標識タンパク質は NAP-10 脱塩カラムを用いて精製した。NAP-10 カラムは 20 mL の 0.25 M 酢酸ナトリウム / 0.5 % ゲンチシン酸で平衡化した。反応混合物は NAP-10 カラムにロードされ、 ^{89}Zr -Df-チオ-トラスツズマブは 1.5 mL の 0.25 M 酢酸ナトリウム / 0.5 % ゲンチシン酸緩衝液 (1.5 mL) で溶出した。必要あらば、 ^{89}Zr -Df-チオ-トラスツズマブは Amicon Ultra-4 フィルターで望む体積に濃縮した。生成物は SEC HPLC (システム A) で分析した。

30

【0295】

実施例 21 インビトロでの血清安定性

0.25 M 酢酸ナトリウム / 0.5 % ゲンチシン酸緩衝液 (0.1 mL) 中の 0.5-1.5 mM (1 mg) の ^{89}Zr -Df-チオ-トラスツズマブコンジュゲートの溶液が新鮮なマウスの血清 (0.9 mL) へ添加され、37 で 0-96 時間インキュベートした。血清溶液の試料 (20 μL) は SEC HPLC (システム A) で分析し、図 24 に示した結果を与えた。

40

【0296】

実施例 22 動物モデル

50

週齢 6 ~ 8 週間のベージュヌード X I D マウスは Harlan Sprague Dawley (リバーモア、カリフォルニア州) から得た。細胞接種前に三日間、マウスは、血清エストロゲン値を維持するために、60 日間徐放性 17 -エストラジオールのペレットを 0.36 mg 注入された (皮下注射 (s. c.) , 左脇腹)。マウスは乳房脂肪パッドに、50 % フェノールレッドフリーマトリゲル中の 5×10^6 BT474M1 細胞を接種された。BT474M1 は、カリフォルニア太平洋医療センター (California Pacific Medical Center) から得られたヒト乳癌細胞株 BT474 のサブクローニングである。動物の管理及び処置は、実験動物管理評価認定協会 (AAALAC) の認定を受けたジェネンテックの機関内動物管理使用委員会で承認されたプロトコールに従った。

10

【0297】

実施例 23 MicroPET イメージング

マウスは、セボフルラン 3 % で麻酔し、尾静脈を経由して等張液中 (100 - 130 μ L) 約 0.1 mCi の ^{89}Zr -放射標識トラスツズマブを静脈内注射され、回復のためのケージに戻された。PET イメージング (図 25) はトレーサー注射後 1 時間、24 時間、96 時間及び 144 時間で Inveon PET / CT スキャナーで以下のように行った。セボフルランで麻酔した動物はスキャナのベッドの上で頭を最初にしてうつむけに配置され、静的な 15 分又 30 分のスキャンが取得された。体温は直腸プローブにより測定し、暖かい空気で保持した。全身の反復画像再構成は、最大事後アルゴリズム (MAP) 、ハイパーべータ (0.05) を用いて得られ、CT から得られた組織密度を用いて信号の減衰を補正した。投影は ASI Pro ソフトウェア (Siemens Preclinical Solutions) で作成され、関心領域解析を用いた目的の各器官の量的活性値を取得するために使用された。

20

【0298】

統計分析 : 図 26 のプロットは、R ソフトウェアのバージョン 2.4.1 (統計コンピューティングのための R 財団、ウィーン、オーストリア) で構築した。統計学的有意差は両側スチューデント t 検定または ANOVA を用いて決定し、0.05 未満の P 値が有意と見なされた ; データは特に明記しない限り平均 \pm 標準偏差として表示される。

【0299】

本発明は、本発明のいくつかの態様の実例として意図されている実施例に開示されている特定の実施態様による範囲内に限定されるものではなく、機能的に等価である任意の実施態様は本発明の範囲内である。確かに、本明細書に示され記載されたものに加えて、本発明の様々な修飾は当業者に明らかとなり、及び添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図されている。

30

【0300】

本明細書全体を通して引用した全ての特許、特許出願、及び参考文献が明示的に援用される。

【図1B】

配列番号

10 20 30
4d5v7fabH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTYIHW

4d5v7fabH EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTYIHW
10 20 30
Kabatの番号付け
40 50 60 70 80
4d5v7fabH VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLS

4d5v7fabH VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLS
40 50 a 60 70 80 abc
90 100 110 120 130
4d5v7fabH RAEDTAVYYCSRWGDDGYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGFSVPPLAPSSK

4d5v7fabH RAEDTAVYYCSRWGDDGYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGFSVPPLAPSSK
90 100abc 110 120
140 150 160 170 180
4d5v7fabH STSGGTAALGCLVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLS

4d5v7fabH STSGGTAALGCLVKDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLS
130 140 150 160 170
190 200 210 220
4d5v7fabH SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSC

4d5v7fabH SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSC
180 190 200 210

Figure 1B

【図2A - B】

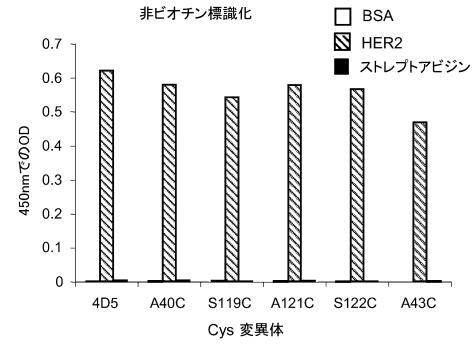


Figure 2A

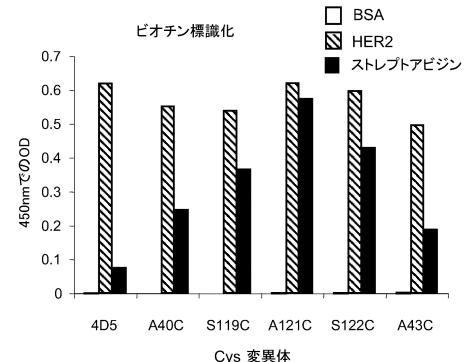


Figure 2B

【図3A - B】

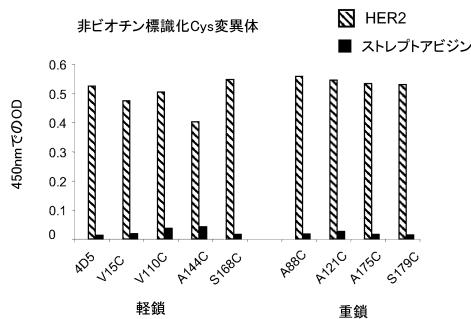


Figure 3A

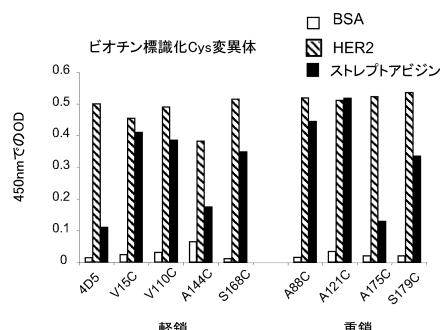


Figure 3B

【図4A - B】

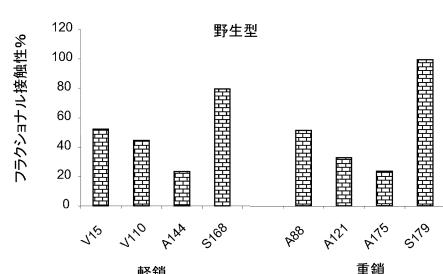


Figure 4A

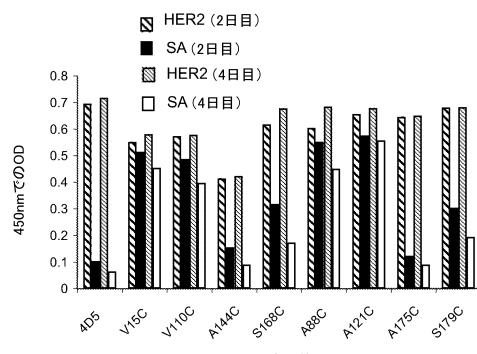
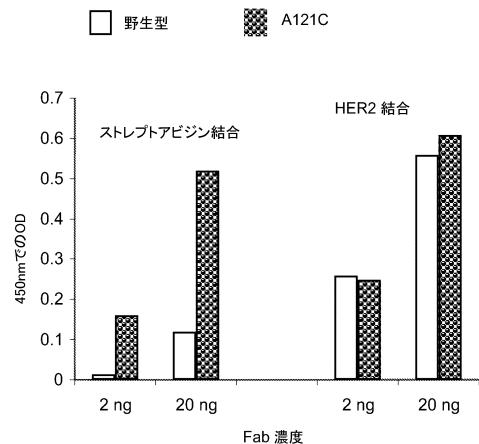


Figure 4B

【図5】



【図6】

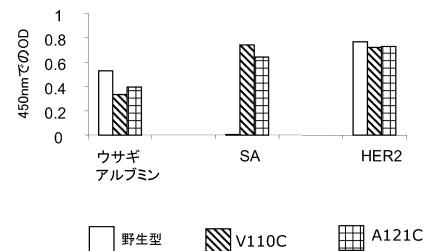


Figure 6

Figure 5

【図7】

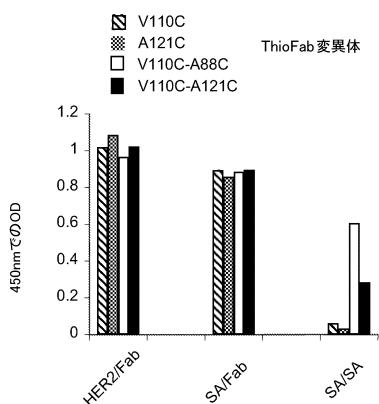


Figure 7

【図8】

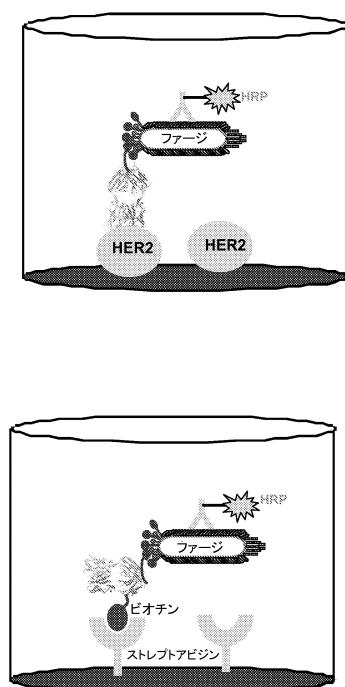


Figure 8

【図 13A - B】

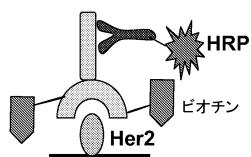


Figure 13A

【図 14A - B】

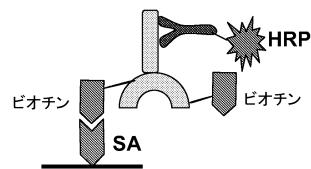


Figure 14A

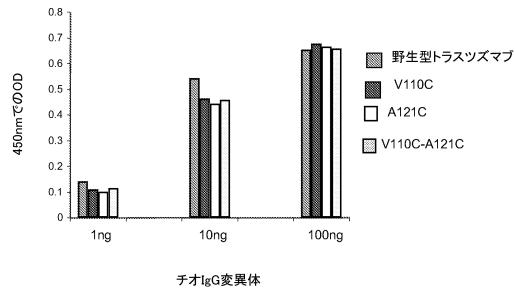


Figure 13B

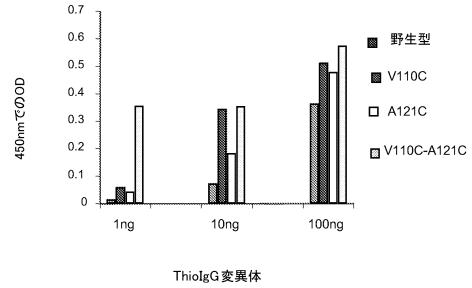


Figure 14B

【図 15】

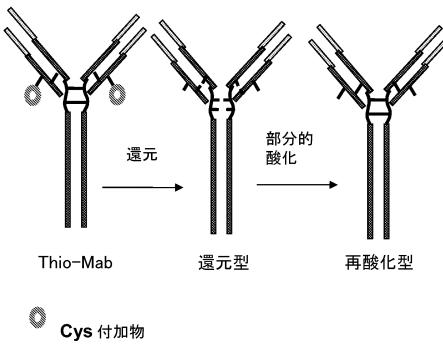


Figure 15

【図 19】

2H9-ThioFc変異体のビオチン標識化

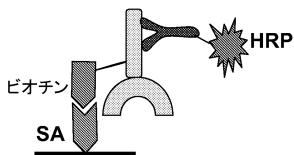
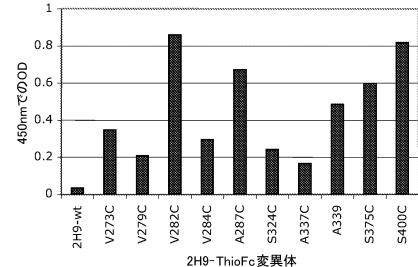


Figure 19

【図20】

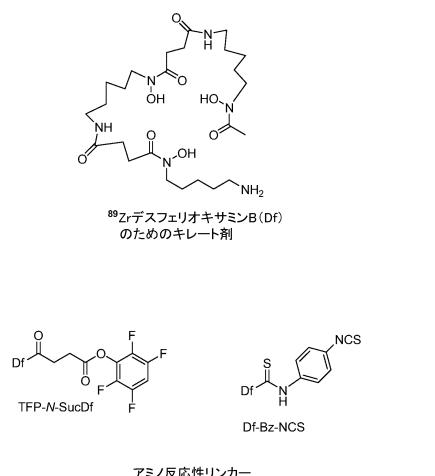


Figure 20

【図21】

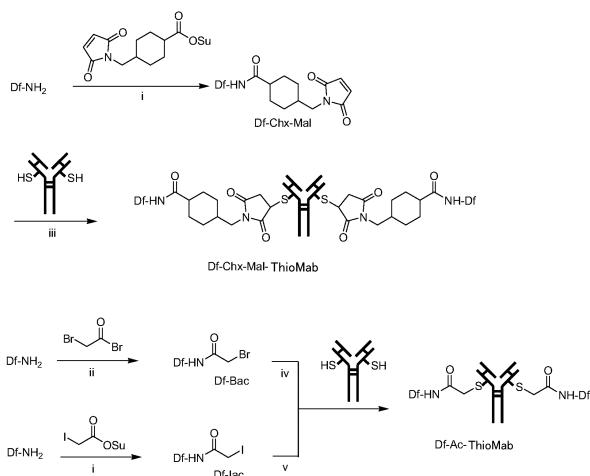
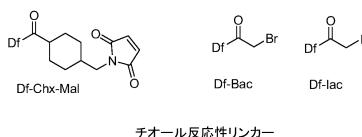


Figure 21



チオール反応性リンカー

Figure 20

【図22】

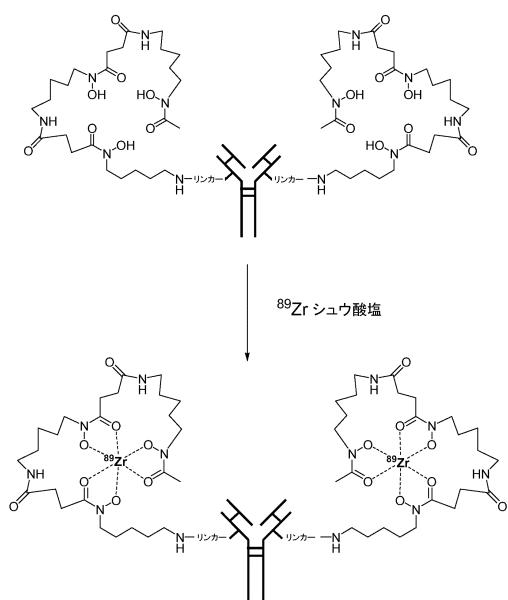


Figure 22

【図23】

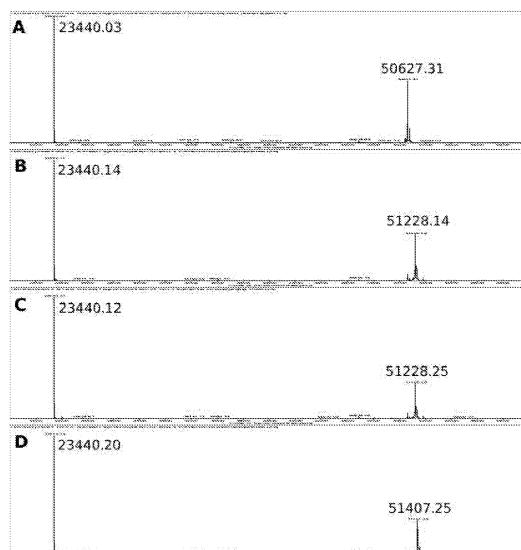


Figure 23

【図24】

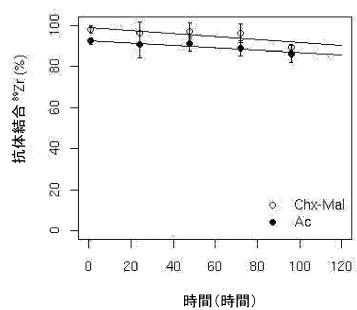


Figure 24

【図 1 A】

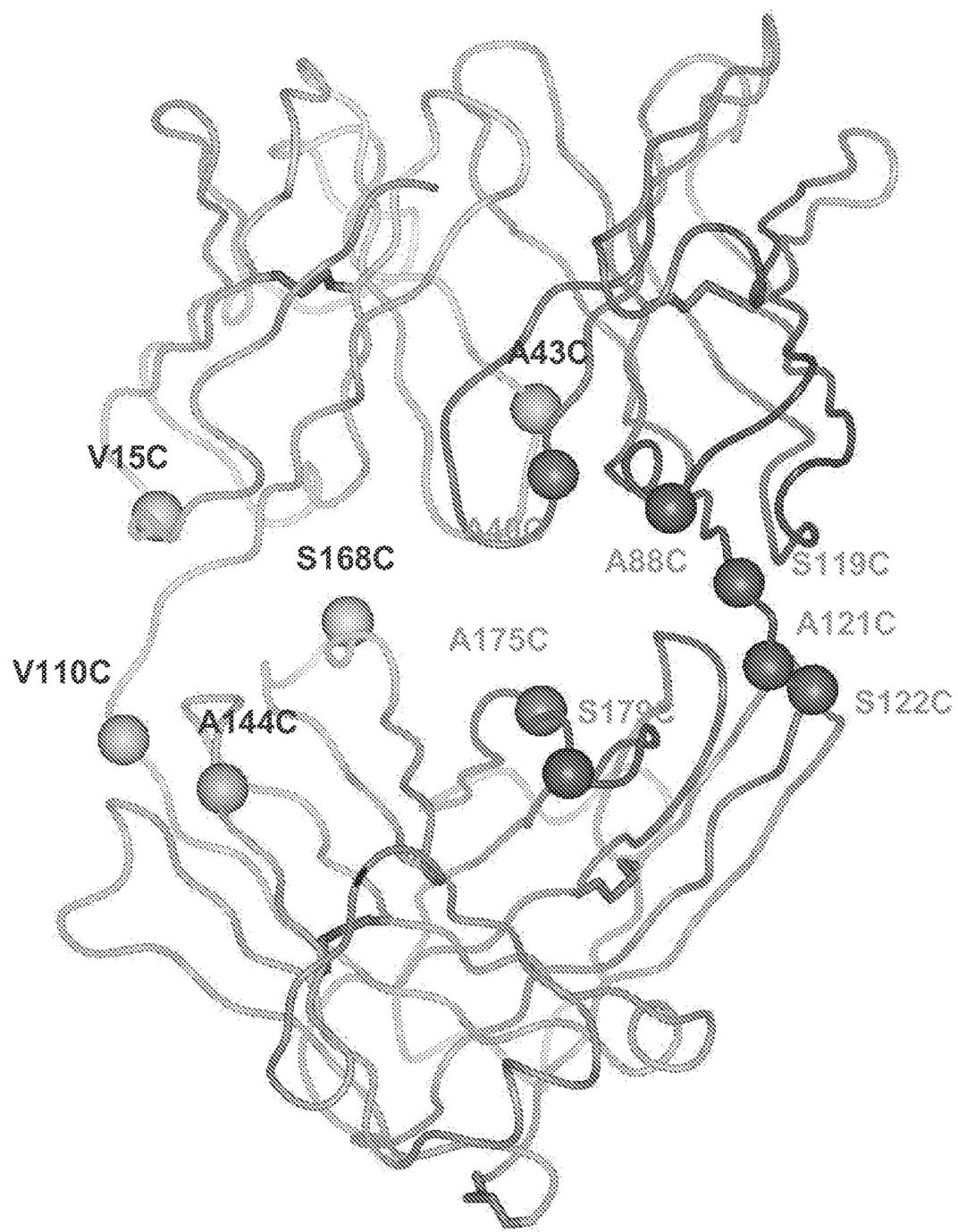


Figure 1A

【図16】

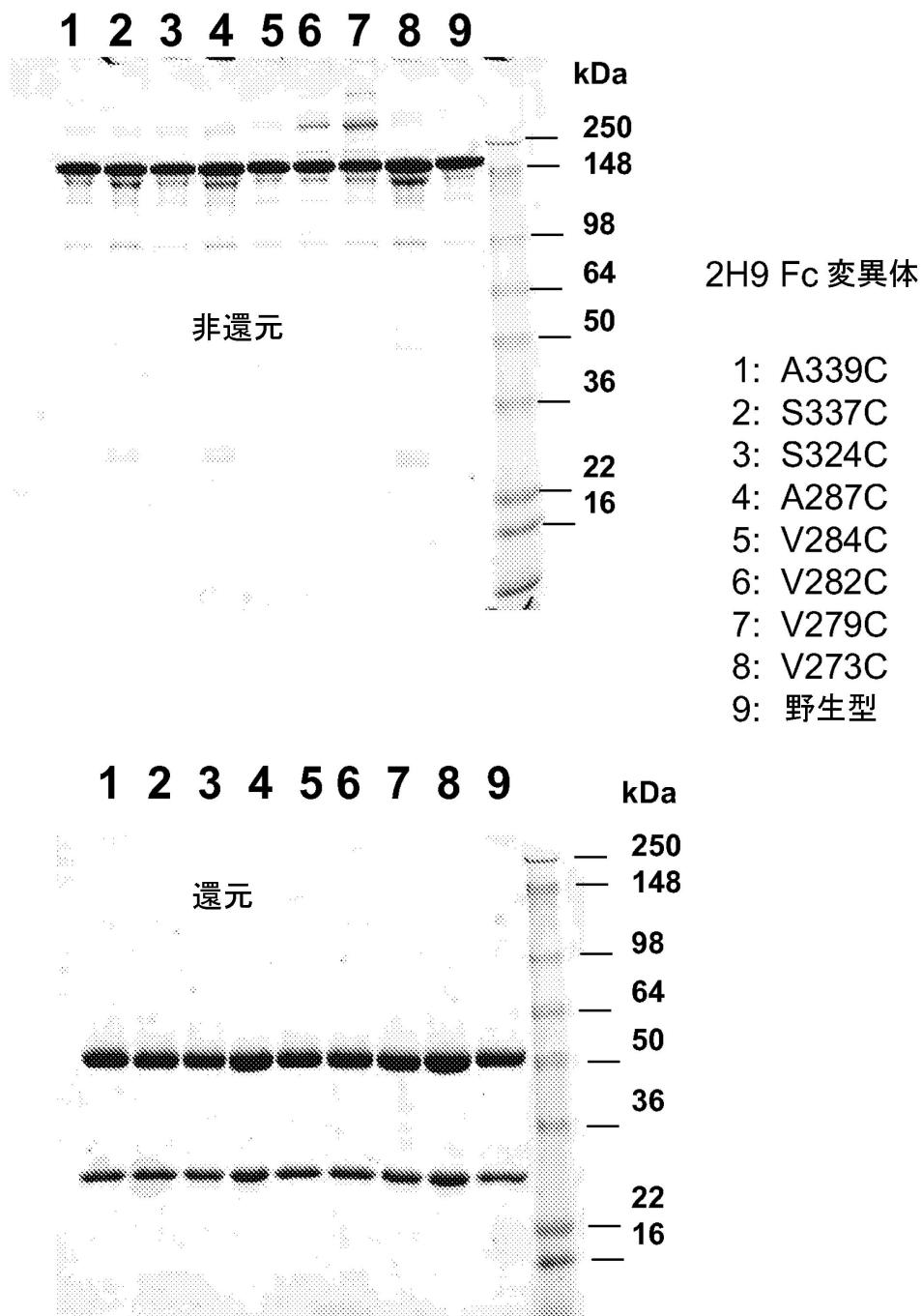


Figure 16

【図 17A - B】

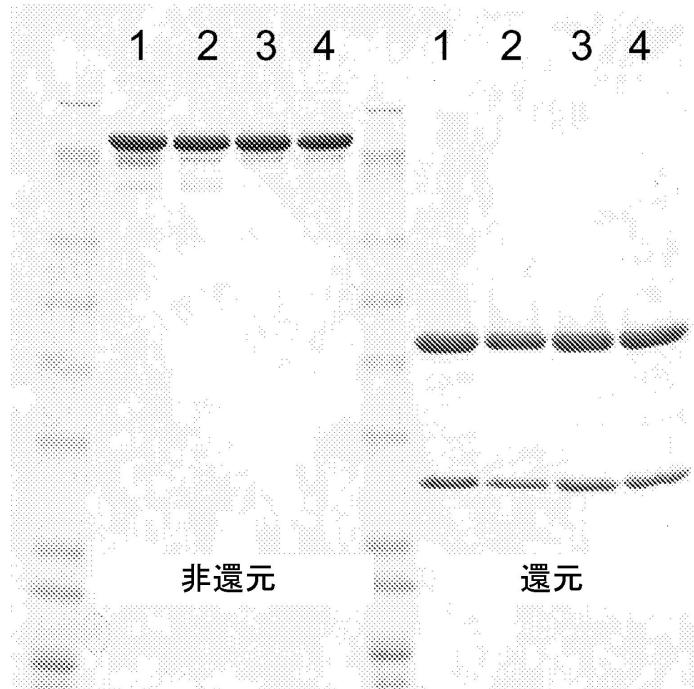


Figure 17A

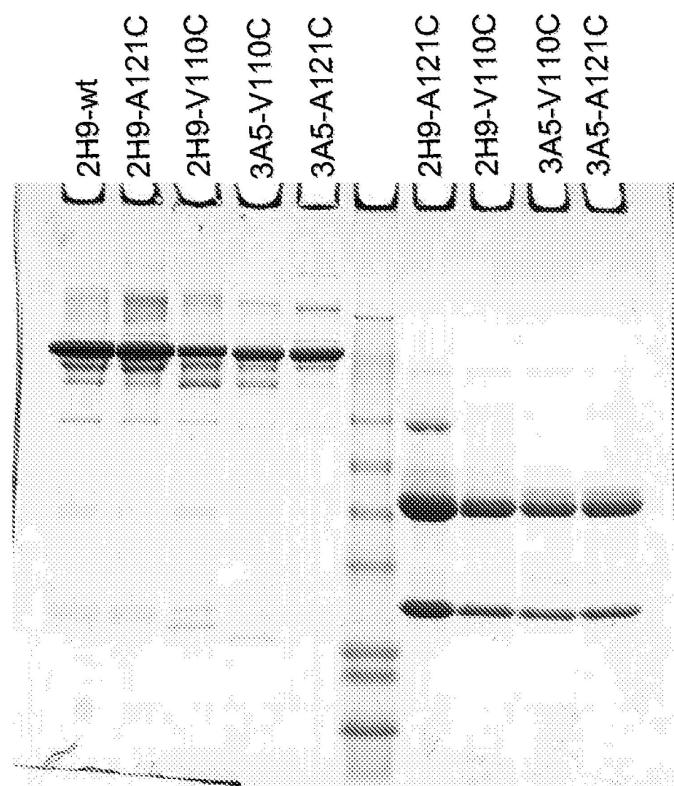


Figure 17B

【図18】

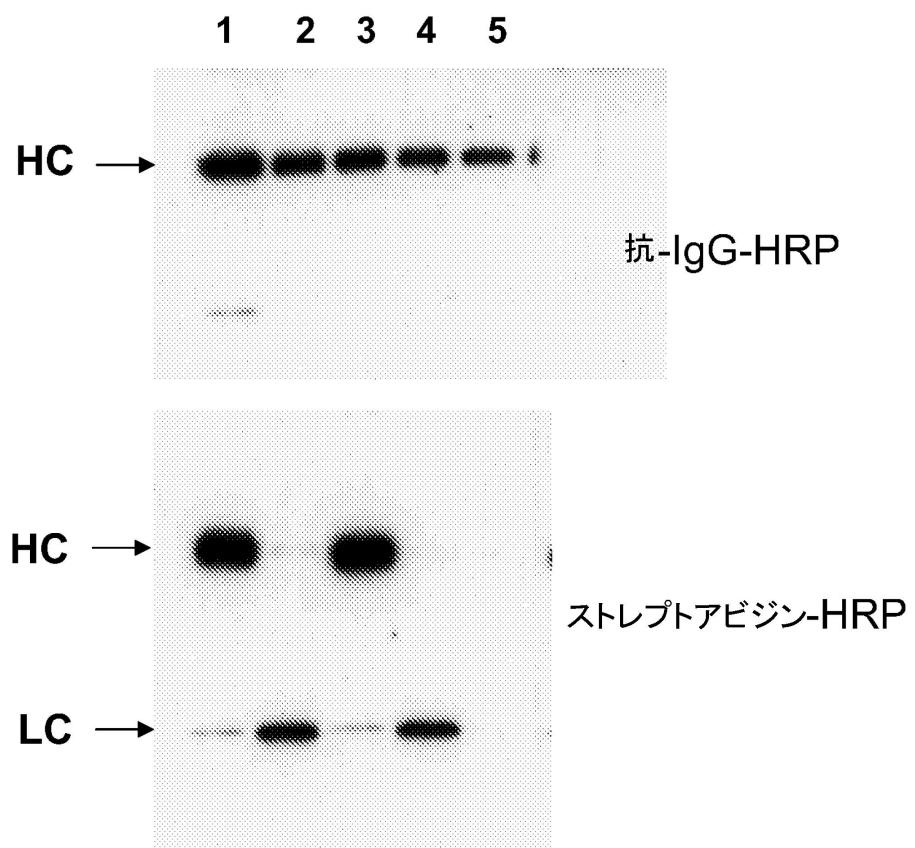


Figure 18

【図25】

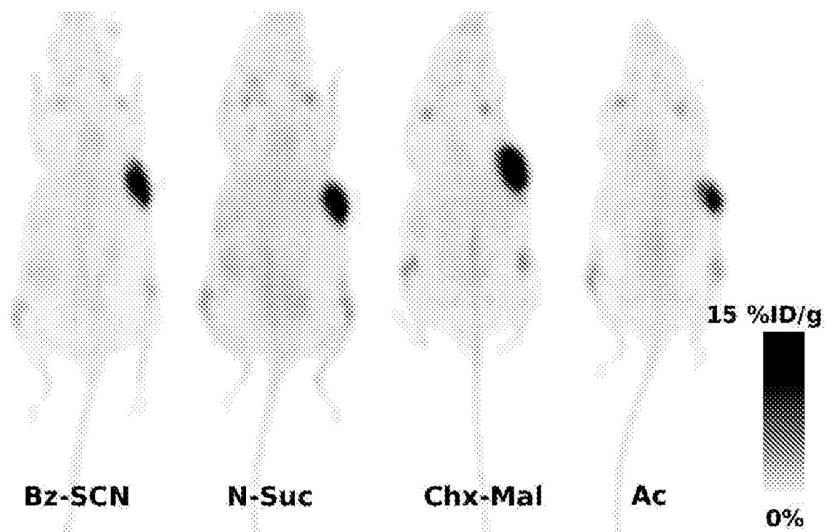


Figure 25

【図26】

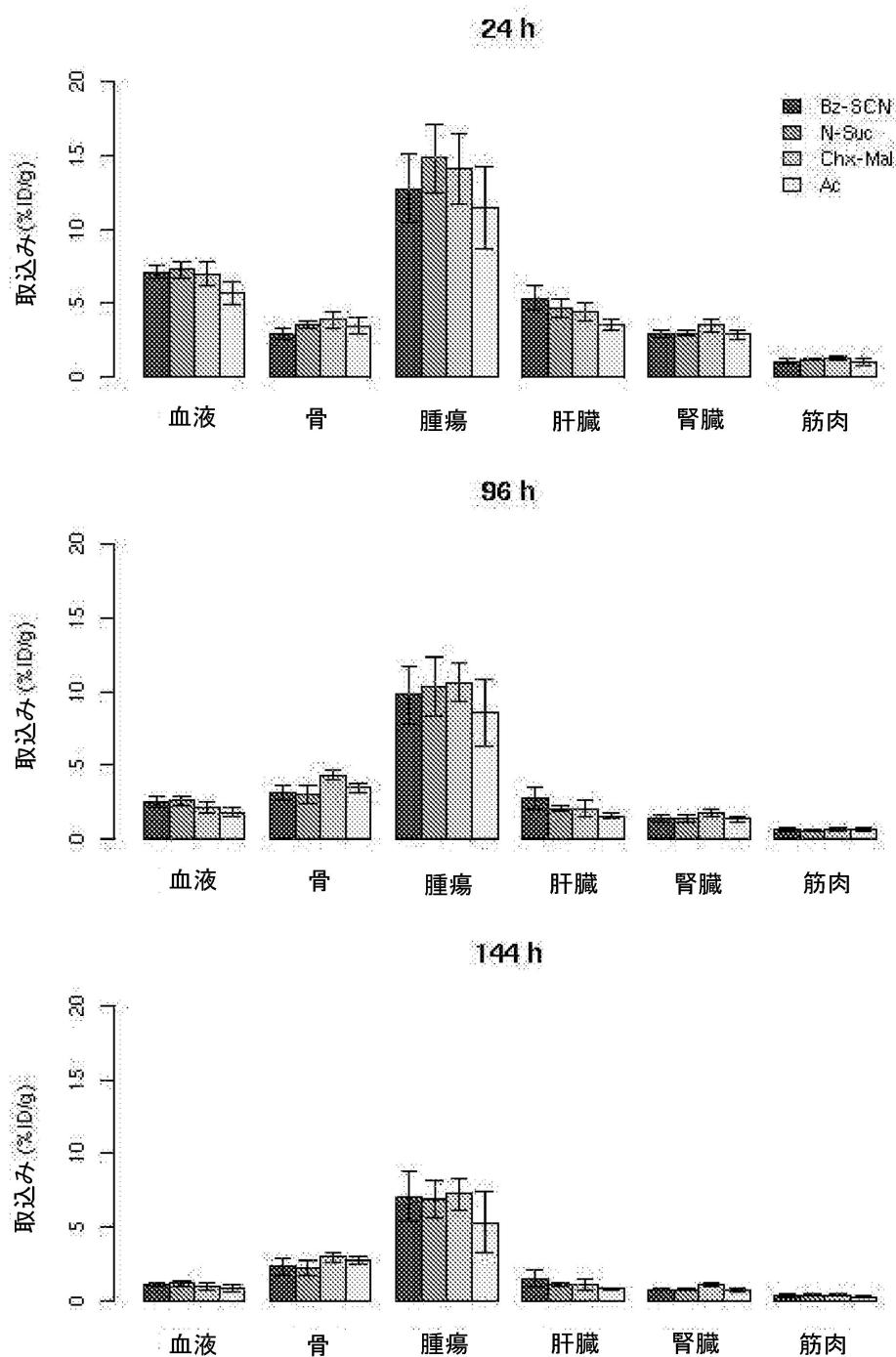


Figure 26

【配列表】

0005850843000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	G 0 1 T	1/161
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
			C 0 7 K	19/00

(72) 発明者 ジュストゥラ , ジャガス アール .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サン フランシスコ , ディーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンティック , インコーポレイテッド

(72) 発明者 ローマン , ヘンリー , ビー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サン フランシスコ , ディーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンティック , インコーポレイテッド

(72) 発明者 マリク , ジャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サン フランシスコ , ディーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンティック , インコーポレイテッド

(72) 発明者 ティニアノ , ジェフ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サン フランシスコ , ディーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンティック , インコーポレイテッド

(72) 発明者 ウィリアムス , サイモン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , サウス サン フランシスコ , ディーエヌエー ウェイ 1 , シー / オー ジェネンティック , インコーポレイテッド

審査官 太田 雄三

(56) 参考文献 特表2008-516896 (JP, A)

DIJKERS E C F , DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CLINICAL-GRADE 89ZR-TRASTUZUMAB FOR HER2/NEU IMMUNOPET IMAGING , JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE , 2009年 6月 , VOL. 50, NO. 6 , PAGES 974-981

GOVINDAN S V , DEFEROXAMINE AS A CHELATOR FOR 67GA IN THE PREPARATION OF ANTIBODY CONJUGATES , NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY , 米国 , ELSEVIER , 2005年 7月 1日 , VOL. 32, NO. 5 , PAGES 513-519

TINIANOW J N , SITE-SPECIFICALLY 89ZR-LABELED MONOCLONAL ANTIBODIES FOR IMMUNOPET , NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY , 2010年 4月 , VOL. 37, NO. 3 , PAGES 289-297

(58) 調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 16 / 0 0
 A 0 1 K 6 7 / 0 2 7
 A 6 1 K 5 1 / 0 0
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 2
 C 0 7 K 1 9 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 P u b M e d
 C i N i i
 W P I D S (S T N)